

ラット腎臓ホスホリパーゼ A₂
の精製および性状解析

原 俊太郎

①

ラット腎臓ホスホリパーゼA₂の精製および性状解析

指導教官 井上 圭三

昭和63年度進学 原 俊太郎

<目次>

第1章 序論	1
第2章 材料と方法	4
(a) ラット腎臓からの酵素源の調製	4
(b) ホスホリパーゼA ₂ 活性の測定	5
(c) 蛋白定量	6
(d) SDSホリアクリルアミドゲル電気泳動	6
(e) DEAEセルロース・カラムによるラット腎臓ホスホリパーゼ A ₂ 活性の分画	7
(f) ホスホリパーゼA ₂ - α の精製	8
(g) ホスホリパーゼA ₂ - β の精製	10
(h) ホスホリパーゼA ₂ - γ の精製	12
(i) 部分精製ホスホリパーゼA ₂ のゲル濾過	14
(j) ホスホリパーゼA ₂ の既知のアイソザイムに対する抗体	14
(k) ポリクローナル抗体によるホスホリパーゼA ₂ 活性の阻害	15
(l) モノクローナル抗体によるホスホリパーゼA ₂ 活性の吸収	15
(m) ホスホリパーゼA ₂ - γ に対するモノクローナル抗体の作製	16
(n) ホスホリパーゼA ₂ - γ のイムノブロットニング	17
(o) ラット腎臓メサングウム細胞の調製と培養	18
(p) ラット腎臓メサングウム細胞の各種刺激	18
(q) ラット腎臓メサングウム細胞に存在するホスホリパーゼA ₂ 活性 のDEAE-5PWによる分画	19

第3章 ラット腎臓ホスホリパーゼA ₂ の精製	21
3-1 序	21
3-2 結果と考察	24
(a) ラット腎臓からの酵素源の調製	24
(b) DEAEセルロース・カラムによるラット腎臓ホスホリパーゼA ₂ 活性の分画	26
(c) ホスホリパーゼA ₂ - α の精製	28
(d) ホスホリパーゼA ₂ - β の精製	33
(e) ホスホリパーゼA ₂ - α 、 β の免疫化学的解析	38
(f) ホスホリパーゼA ₂ - γ の精製	42
(g) 精製にともなうホスホリパーゼA ₂ の分子量の変化	46
(h) ホスホリパーゼA ₂ - γ の免疫化学的解析	49
(i) ホスホリパーゼA ₂ - γ の酵素化学的解析	54
3-3 まとめと考察	59
第4章 ラット腎臓メサンギウム細胞におけるホスホリパーゼA ₂ の機能の解析	61
4-1 序	61
4-2 結果と考察	64
(a) ラット腎臓メサンギウム細胞のホスホリパーゼA ₂ 活性	64
(b) 細胞外からの刺激に伴うメサンギウム細胞ホスホリパーゼA ₂ 活性の変化	67
(c) 細胞外ホスホリパーゼA ₂ のプロスタグランジン産生亢進作用	74
4-3 まとめと考察	77
REFERENCES	79
謝辞	85

第1章 序論

リン脂質は、コレステロール、タンパク質とともに、細胞膜の主要な構成成分である。細胞膜は、単に細胞を外界から区別しているだけではなく、細胞内外の情報伝達のものであり、そこには、外界を認識する受容体やさまざまな酵素、輸送系が存在する。近年、さまざまな生理活性脂質が見いだされ、その前駆体としてのリン脂質の重要性が論じられている。細胞外からのさまざまな刺激に応答し、細胞膜においてリン脂質代謝反応が亢進し、細胞膜のリン脂質から生理活性脂質、脂質性メディエーターが産生される。

細胞膜におけるリン脂質代謝はさまざまな酵素によって触媒されているが、その中でも脂質性メディエーター産生において最も重要であるのは、グリセロリン脂質グリセロール2位のエステル結合を加水分解し、遊離脂肪酸およびリゾリン脂質を生成するホスホリパーゼA₂である¹⁾。

種々の生理活性を示すプロスタグランジン、ロイコトリエン、トロンボキサンなどエイコサノイドは、アラキドン酸をはじめとするエイコサポリエン酸から合成される。これらの脂肪酸は、細胞内では遊離の状態では存在せず、グリセロリン脂質グリセロール2位にエステル結合した形で存在するため、リン脂質からのエイコサポリエン酸の切り出しがエイコサノイド産生の律速段階で

あると考えられている²⁾。ホスホリパーゼ A₂はこの律速段階をつかさどる酵素の1つである。ホスホリパーゼ C の作用によりリン脂質から生成したジアシルグリセロールから、ジアシルグリセロールリパーゼによりエイコサポリエン酸が生成する経路も知られているが、細胞によっては、ホスホリパーゼ C の作用を阻害した場合にも細胞外からの刺激に応じアラキドン酸が遊離するという報告もあり³⁾、エイコサポリエン酸の切り出しには、おもにはホスホリパーゼ A₂が関与すると考えられる。

また、エイコサノイド同様に、種々の生理活性を示す PAF (1-アルキル-2-アセチルグリセロホスホコリン) の生合成においても、ホスホリパーゼ A₂は重要である⁴⁾。PAF の生合成経路の1つとして、ホスホリパーゼ A₂ の作用により、膜リン脂質中の1-アルキル-2-アシルグリセロホスホコリンから生成した1-アルキルグリセロホスホコリンに、アセチルトランスフェラーゼの作用によりアセチル基が付加される経路が知られている。

このように、ホスホリパーゼ A₂は、生体内のさまざまな臓器、細胞で産生され、その恒常性を維持するために機能していると考えられる脂質性メディエーター産生のキーエンザイムである。しかし、これまでに、いかなるホスホリパーゼ A₂が脂質性メディエーター産生に関与するか、刺激によりいかにホスホリパーゼ A₂が活性化されるかについての知見は、ほとんど得られていない。そこ

で、本研究では、生体内において実際に脂質性メディエーター産生に関与していると考えられるホスホリパーゼ A_2 を、精製し、性状を解析し、さらにはその活性の調節機構の一端を明らかにすることを目的とした。

その酵素源として、私は腎臓を用いた。腎臓はさまざまな臓器の中でも、脂質性メディエーター産生が盛んな臓器の1つである。バソプレッシンなど血管作動性ホルモンの作用や、体液電解バランスの変化に呼応して、腎臓で産生されたプロスタグランジン（おもにプロスタグランジン E_2 ）は、糸球体濾過量、腎血流量の維持、尿管におけるナトリウムイオン、塩素イオン、水の再吸収の抑制、レニン分泌促進など、腎機能を維持するために働いている⁵⁾。PAFもまた、腎臓で産生され、血圧の調節に関わっている⁶⁾。一方、糸球体腎炎など、さまざまな腎疾患と脂質性メディエーターの異常産生との関連も注目されている。また、遺伝的に高血圧になりやすい実験動物において、腎臓におけるプロスタグランジン産生の低下が報告されている⁷⁾。生体恒常性を維持するための刺激、あるいは炎症刺激ほか様々な病的な刺激に応じ、腎臓で脂質性メディエーターが亢進する際には、いかなるホスホリパーゼ A_2 が関与し、いかに活性調節がおこなわれるのだろうか。本研究では腎臓における脂質性メディエーター産生に関わると考えられるホスホリパーゼ A_2 についてその精製および性状解析を行い、さらに腎臓由来細胞を用い、その活性の調節機構を検討した。

第2章 材料と方法

(a) ラット腎臓からの酵素源の調製

SDラット（日本生物材料センターより購入）をエーテル麻酔後、断頭、瀉血し、血液をできるだけ除いた。腎臓を2つとも摘出し、解剖バサミで細かく切断し、湿重量5gの腎臓片に対し、0.25Mショ糖、1mM EDTAを含む10mMトリス塩酸緩衝液（pH7.4）（以下、ホモジナイジングバッファー）45mlを加え、ポッター式ホモジナイザーにより、ホモジナイズした（1000rpm、5ストローク）。ホモジネートを4℃、600xg、10分遠心した後、上清を回収し（この操作により、未破壊組織および核成分を除く。）、この上清を4℃、100,000xg、1時間超遠心する（日立RP42ローターを用いる。）ことにより、膜画分と可溶性画分を得た。膜画分はホモジナイジングバッファーにより可溶化した。

可溶性画分のポリエチレングリコール沈澱は以下のように行った。すなわち、可溶性画分に、等容量の20%ポリエチレングリコールを含むホモジナイジングバッファーをゆっくりと滴下した後、30分攪拌する。この溶液を4℃、9000rpm、20分（TOMY No.9ローターを用いる。）遠心し、10%ポリエチレングリコール沈澱を得た。沈澱はホモジナイジングバッファーにより可溶化した。

(b) ホスホリパーゼ A₂ 活性の測定

ホスホリパーゼ A₂ 活性は、1-バルミトイル-2-[1-¹⁴C]アラキドノイルグリセロホスホエタノールアミン (58mCi/mmol, NEN) から切り出されるアラキドン酸の放射活性を測定することにより求めた。基質特異性を検討する際には、他に、1-バルミトイル-2-[1-¹⁴C]リノレオイルグリセロホスホエタノールアミン (58mCi/mmol, Amersham)、1-ステアロイル-2-[1-¹⁴C]アラキドノイルグリセロホスホコリン (58mCi/mmol, Amersham)、村上誠氏より頂いた1-アシル-2-[1-¹⁴C]リノレオイルグリセロホスホセリン (12mCi/mmol) を基質として用いた。

まず、有機溶媒中に溶けた放射標識リン脂質を小試に分取し、N₂ガスにより有機溶媒を除去後、lipid filmとする。これに蒸留水を加え、vortex mixerによりfilmをはがし懸濁液とし、この懸濁液をバスタイプsonicatorによりソニケートし、基質として用いた。酵素反応は、基質2μM、酵素、塩化カルシウム4mM、トリス塩酸緩衝液 (pH9.0) 100mMからなる総量250μlの反応溶液を37℃においてインキュベーションすることによりおこなった。酵素量および反応時間は基質の約10% (約50pmol) が加水分解される条件に設定した。

反応終了後、反応溶液にDoleの試薬⁸⁾ (1N硫酸/イソプロパノール/n-ヘプタン (2/78/20)) 1.25mlを加

え反応をとめ、さらに、蒸留水0.5ml、*n*-ヘプタン0.75mlを加え、vortex mixerにて攪拌後、3000rpm、5分の遠心を行い、二層に分ける。上層より0.8mlを採取し、これにさらに*n*-ヘプタン0.75ml、小さじ一杯のケイ酸（和光純薬、Wakogel C-200）を加え、攪拌後、3000rpm、5分遠心して粉末を沈澱させ、上清をすべてバイアル瓶に移し、液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定し、ホスホリパーゼA₂活性を求めた。

（c）蛋白定量

BCA Protein Assay Kit（Pierce）を用い行った。スタンダードとしては、牛血清アルブミン（和光純薬）を用いた。

（d）SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動

Laemmliの方法²⁾に従い行った。分離ゲルは0.1% SDS、0.15Mトリス塩酸緩衝液（pH8.8）を含む15%アクリルアミドゲル、濃縮ゲルは0.1% SDS、0.15Mトリス塩酸緩衝液（pH6.8）を含む4%アクリルアミドゲルとし、泳動バッファーは0.1% SDSを含む0.15Mトリス-グリシン緩衝液（pH8.6）を用いた。サンプルはサンプルバッファー（0.18Mトリス塩酸緩衝液（pH6.8）、6% SDS、30%グリセロール、15%2-メルカプトエタノール）と

2: 1に混合し、100℃で5分以上加熱してからアブライした。泳動は電流一定で行い、試料が分離ゲルに入るまでは15-20mA、分離ゲルに入ってから25mAで泳動した。泳動終了後、銀染色した。分子量マーカーとしてはPharmaciaのキット(Phosphorylase b (94kDa), Bovine Serum Albumin (67kDa), Ovalbumin (43kDa), Carbonic Anhydrase (30kDa), Soybean Trypsin Inhibitor (20.1kDa), α -Lactalbumin (14.4kDa))を用いた。

(e) DEAEセルロース・カラムによるラット腎臓
ホスホリパーゼA₂活性の分画

DEAEセルロースDE 52(Whatmann)をホモジナイジングバッファー中で膨潤、平衡化した後、Bio-Radのエコノカラム(φ25mm×20cm)に膨潤ゲル容量75mlになるように充填した。このカラムに、ラット腎臓ホモジネート可溶性画分の10%ポリエチレングリコール沈澱を、バリストポンプを用い、流速約1ml/minにてアブライした。アブライした後、1mM EDTAを含む10mMトリス塩酸緩衝液(pH7.4)により、カラムを溶出液の280nmにおける吸光度が0.1以下になるまで洗浄した。次いで、グラジエントメーカーを用い、溶出液の塩化ナトリウム濃度を2Mまで上昇させ、カラムに吸着したタンパク質を溶出した。分画は1fraction=7mlとした。

(f) ホスホリバーゼ $A_2-\alpha$ の精製

① CMセファロース・カラム

CMセファロース (Pharmacia) をホモジナイジングバッファーにより平衡化した後に、Bio-Radのエコノカラム (φ 25mm×20cm) に膨潤ゲル容量 80ml になるように充填した。このカラムに、DEAEセルロースにより分画したホスホリバーゼ $A_2-\alpha$ 画分を、ペリスタポンプを用い、流速約 0.5ml/min にてアブライした。アブライ後、1mM EDTA を含む 10mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) により、カラムを溶出液の 280nm における吸光度が 0.1 以下になるまで洗浄した。次いで、グラジエントメーカーを用い、溶出液の塩化ナトリウム濃度を 0.5M にまで上昇させ、カラムに吸着したタンパク質を溶出した。分画は 1 fraction = 7 ml とした。

② フェニルトヨバール・カラム

フェニルトヨバール 650M (東ソー) を Bio-Rad のエコノカラム (φ 25mm×20cm) に膨潤ゲル容量 75ml になるように充填した後、1mM EDTA、1.5M 塩化ナトリウムを含む 10mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) により平衡化した。CMセファロースカラムのホスホリバーゼ A_2 活性画分に氷中において塩化ナトリウムを加え攪拌し塩化ナトリウム濃度 1.5M とし、このカラムに、ペリスタポンプを用い、流速約 1ml/min にてアブライした。カラムを同じ組成の緩衝液により十分に洗浄した後、塩化ナトリウムを含まない

緩衝液により、カラムに吸着したタンパク質を溶出した。
分画は1fraction=7mlとした。

③ Superose12ゲル濾過FPLC

Superose12HR10/30ゲル濾過FPLC (Pharmacia) のカラムを、島津製作所のLC7A・HPLCシステムに接続し、0.15M塩化ナトリウムを含む10mMトリス塩酸緩衝液(pH7.4)により平衡化した。緩衝液は使用前にゲルマンサイエンス社の液クロディスク(0.45 μ m)を用いfiltrateした。このカラムに、フェニルトヨバールのホスホリバーゼA₂活性画分をセントリコン10 (Amicon) による限外濾過により1.5mlまで濃縮し、これをfiltrateしたものを、500 μ lずつinjectし、流速0.5ml/minにて分画した。分画は1fraction=1mlとした。

④ TSKフェニル5PW-RP (逆相HPLC)

TSKフェニル5PW-RP (φ46mmx7.5cm、東ソー) を、GilsonのHPLCシステム (Model302, pump; Model1802C, monometric module; Model1811, dynamic mixture; Model1001, UV-Master; MS-1-MarkII, system controller) に接続し、0.1%トリフルオロ酢酸/アセトニトリル(95/5(v/v)) (以下溶媒A) により平衡化した。使用溶媒は、FPLCを用いるときと同様に使用前にゲルマンサイエンス社の液クロディスク(0.45 μ m)を用いfiltrateした。

このカラムにまず、Superose12カラムのホスホリバーゼA₂活性画分を1mlずつ数回重ねうちし、カラムを溶媒

Aにより10分間洗浄した後、吸着したタンパク質をアセトニトリルの濃度勾配（溶媒Aから溶媒B（0.1%トリフルオロ酢酸/アセトニトリル（45/55(v/v)）へ50分間、1%/minのアセトニトリル濃度勾配）により溶出した。流速は0.5ml/minとした。

1回の分画では酵素活性は主たるタンパク質のピークと重なって溶出されなかったので、さらにもう1回フェニル5PW-RPによる分画を行った。1回目のフェニル5PW-RPホスホリパーゼA₂活性画分を、溶媒Aにより10倍に希釈し、これを溶媒Aで平衡化したカラムにアブライした。2回目は、アセトニトリルの濃度勾配を、溶媒Aから溶媒Bへ60分間、0.84%/minに変更した。

分画は、1回目、2回目ともに1fraction=1mlとした。

（g）ホスホリパーゼA₂-βの精製

①フェニルトヨバル・カラム

フェニルトヨバル650M（東ソー）をBio-Radのエコノカラム（φ25mm×8cm）に膨潤ゲル容量35mlになるように充填し、1mM EDTA、1M塩化ナトリウムを含む10mM トリス塩酸緩衝液（pH7.4）により平衡化した。DEAEセルロースにより分画したホスホリパーゼA₂-β画分に水中において塩化ナトリウムを加え攪拌し塩化ナトリウム濃度1Mとし、このカラムに、ベリスタポンプを用い、流速約1ml/minにてアブライした。カラムを同じ組成の緩

衝液により十分に洗浄した後、塩化ナトリウムを含まない緩衝液により、カラムに吸着したタンパク質を溶出した。分画は1fraction=7mlとした

② D E A E セファセル・カラム

D E A E セファセル (Pharmacia) を 1mM EDTA を含む 10mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.4) により平衡化した後、Bio-Rad のエコノカラム (φ 15mm x 15cm) に膨潤ゲル容量 15ml になるように充填した。このカラムに、フェニルトヨバールカラムのホスホリパーゼ A₂ 活性画分を、パリスタポンプを用い、流速約 0.5ml/min にてアブライした。カラムを同じ組成の緩衝液により十分に洗浄した後、グラジエントメーカーを用い、溶出液の塩化ナトリウム濃度を 1M にまで上昇させ、カラムに吸着したタンパク質を溶出した。分画は1fraction=7mlとした。

③ T S K エーテル-5 P W H P L C

T S K エーテル-5 P W (φ 75mm x 7.5cm、東ソー) を島津製作所の L C 7 A ・ H P L C システムに接続し、2M 硫酸を含む 10mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.4) により平衡化した。緩衝液はfiltrateしてから用いた。このカラムに、D E A E セファセルのホスホリパーゼ A₂ 活性画分に硫酸を加え、2M 硫酸としたものを、2ml ずつ数回に分けてinjectした。カラムは、2M 硫酸を含む緩衝液により 10 分間洗浄した後、20 分間かけ硫酸濃度を 0M まで落とし、さらにこの硫酸を含まない緩衝液により洗浄した。流速は 0.5ml/min とし、分画は1fraction=1.5ml とした。

④ 逆相 H P L C

資生堂の Capcell PAK C8 カラム (φ 46mm x 15cm) を Gilson の H P L C システム ((f) ④ と同一のシステム) に接続し、逆相 H P L C 溶媒 A により平衡化した。使用溶媒は使用前に filtrate し用いた。このカラムに、エーテル - 5 P W カラムのホスホリバーゼ A₂ 活性画分を 1ml ずつ数回重ねうちし、カラムを溶媒 A により 10 分間洗浄した後、吸着したタンパク質をアセトニトリルの濃度勾配 (溶媒 A から溶媒 B へ 50 分間、1% / min のアセトニトリル濃度勾配) により溶出した。流速は 0.5ml / min とし、分画は 1 fraction = 1ml とした。

(h) ホスホリバーゼ A₂ - γ の精製

① フェニルトヨパール・カラム

フェニルトヨパール 650 M (東ソー) を Bio-Rad のエコノカラム (φ 15mm x 15cm) に膨潤ゲル容量 20ml になるように充填し、1mM EDTA、1M 塩化ナトリウムを含む 10mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) により平衡化した。DEAE セルロースにより分画したホスホリバーゼ A₂ - γ 画分に水中において塩化ナトリウムを加え攪拌し塩化ナトリウム濃度 1M とした、このカラムに、ベリスタポンプを用い、流速約 1ml / min にてアブライした。カラムを同じ組成の緩衝液により十分に洗浄した後、塩化ナトリウムを含まない緩衝液により、カラムに吸着したタンパク質を溶

出した。分画は1fraction=7mlとした

②ブルーセファロース・カラム

ブルーセファロース (Pharmacia) を1mM EDTAを含む10mMトリス塩酸緩衝液 (pH7.4) により平衡化した後に、Bio-Radのエコノカラム (φ15mmx10cm) に膨潤ゲル容量10mlになるように充填した。このカラムに、フェニルトヨバールカラムのホスホリパーゼA₂活性画分を、ベリスタポンプを用い、流速約0.5ml/minにてアブライした。カラムを同じ組成の緩衝液により十分に洗浄した後、グラジエントメーカーを用い、溶出液の塩化ナトリウム濃度を2Mにまで上昇させ、カラムに吸着したタンパク質を溶出した。分画は1fraction=7mlとした。

③Superose12ゲル濾過FPLC

Superose12HR10/30ゲル濾過FPLC (Pharmacia) のカラムを、島津製作所のLC7A・HPLCシステムに接続し、0.15M塩化ナトリウムを含む10mMトリス塩酸緩衝液 (pH7.4) により平衡化した。緩衝液はfiltrateしてから用いた。このカラムに、ブルーセファロースのホスホリパーゼA₂活性画分をセントリコン10 (Amicon) による限外濾過により2mlまで濃縮し、これをfiltrateしたものを、500μlずつinjectし、流速0.5ml/minにて分画した。分画は1fraction=1mlとした。

(i) 部分精製ホスホリパーゼ A₂ のゲル濾過

セファデックス G-75 Superfine (Pharmacia) を 0.15M 塩化ナトリウムを含むトリス塩酸緩衝液 (pH7.4) で膨潤させた後脱気した後、Bio-Rad のエコノカラム (φ 15mm x 50cm) に充填し、試料 1ml をアプライした。1% コール酸ナトリウム存在下ゲル濾過を行う際は、カラムを 1% コール酸ナトリウム、0.15M 塩化ナトリウムを含むトリス塩酸緩衝液 (pH7.4) で十分に置換してから用いた。

(j) ホスホリパーゼ A₂ の既知のアイソザイムに対する抗体

ラット分子量 14 キロダルトン・グループ II 型ホスホリパーゼ A₂ に対するウサギ・ポリクローナル抗体は、村上誠氏より頂いた¹⁰⁾。一方、ラット・グループ I 型ホスホリパーゼ A₂ に対するポリクローナル抗体は、岡本らの方法¹¹⁾に従い、ラット膵臓よりグループ I 型ホスホリパーゼ A₂ を精製し、この酵素をウサギに免疫することにより調製した抗体を、高橋勝彦氏より頂いた。

一方、アラキドン酸含有リン脂質を選択的に加水分解するホスホリパーゼ A₂ に対するマウス・モノクローナル抗体は、藤守由美氏より頂いた。本抗体は、ウサギ血小板細胞質より精製した酵素に対し作成したものであるが、ラット血小板細胞質から部分精製した同じ性質を示す酵素と交叉性を示す¹²⁾。

(k) ポリクローナル抗体によるホスホリパーゼA₂
活性の阻害

ホスホリパーゼA₂活性を有する標品を、エッペンドルフ（1.5ml）中、適当量のポリクローナル抗体と混合し、室温にて30分間反応させた後、ホスホリパーゼA₂活性を測定した。

(l) モノクローナル抗体によるホスホリパーゼA₂
活性の吸収

ホスホリパーゼA₂活性を有する標品を、まず、エッペンドルフ（1.5ml）中、適当量のモノクローナル抗体（あるいは抗体産生ハイブリドーマの培養上清）と混合し、室温にて30分間反応させる。この反応溶液に、さらに、0.15M塩化ナトリウムを含むトリス塩酸緩衝液（pH7.4）にサスペンドしたBio-Radのイムノビーズ（Anti-Mouse Immunoglobulins-conjugated Beads）を加え、室温にて30分間反応させる。遠心により、ビーズを沈殿させた後、上清の一部分をとり、ホスホリパーゼA₂活性を測定した。

(m) ホスホリパーゼ $A_2-\gamma$ に対するモノクローナル抗体の作製

ホスホリパーゼ $A_2-\gamma$ の部分精製標品約 $2\mu g$ をしみこませたニトロセルローズ紙 ($1\times 1cm$, Bio-Rad) を、ハサミで細かく切断した後、 $250\mu l$ の P B S 中にてホモジナイズする。まず、このうちの半分を Balb/c マウス (♀、8 週令、日本生物材料センターより購入) に脾内投与し、30 日後、同じ操作を繰り返し、2 回目の脾内投与をおこなう。2 回目の投与の 3 日後にマウスより脾臓を摘出し、脾臓細胞をマウス・ミエローマ X63-Ag8.6.5.3 と細胞融合し、抗体産生ハイブリドーマを作製した。細胞融合の 10 日後、ブルーセファロースで分画した後のホスホリパーゼ $A_2-\gamma$ 部分精製標品を抗原として用いた E L I S A 法により、ハイブリドーマの培養上清のスクリーニングを行う。陽性と判断したハイブリドーマの培養上清を用い、さらに、ブルーセファロースで分画した後のホスホリパーゼ $A_2-\gamma$ 部分精製標品を抗原とし、(1) の方法による酵素活性の吸収実験をおこなう。両方の方法により陽性と判断したハイブリドーマについて、limiting dilution を 2 回おこない、抗ホスホリパーゼ $A_2-\gamma$ モノクローナル抗体産生クローン 4 株を得た。モノクローナル抗体は、それぞれのクローンを大量培養し、その培養上清から、硫酸沈殿、ゲル濾過 H P L C により精製することにより得た。抗体のサブクラスの決定は、抗体をブレー

トにまき、抗マウス Ig G 抗体および抗マウス Ig M 抗体を用いた E L I S A により行った。

(n) ホスホリパーゼ A₂- γ のイムノブロットティング

(h) においてフェニルトヨパールで分画した後のホスホリパーゼ A₂ 活性画分をさらに Superose12 ゲル濾過 F P L C により精製し、このカラムによる酵素活性画分について、S D S - P A G E を行なう。分離後のゲル上のタンパク質を、ニトロセルロース紙に、Millipore の MilliBlot-SDE を用いトランスファーする。このニトロセルロース紙を、まず、3% 牛血清アルブミンを含む P B S で一晩ブロッキングし、P B S で洗浄後、抗体産生ハイブリドーマ培養上清と 2 時間反応させる。P B S で洗浄後、次に、ビオチニル化抗マウス・イムノグロブリン抗体と 2 時間反応させる。再度 P B S と洗浄後、アルカリリンフォスファターゼと 1 時間反応させてから、ニトロブルーテトラゾリウム、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸二ナトリウムで発色する。この時、分子量マーカー、タンパク質のトランスファーのマーカーとしては、Bio-Rad のプレステインド・マーカーのキット (Phosphorylase b (130kDa), Bovine Serum Albumin (75kDa), Ovalbumin (50kDa), Carbonic Anhydrase (39kDa), Soybean Trypsin Inhibitor (27kDa), Lysozyme (17kDa)) を用いた。

(o) ラット腎臓メサングウム細胞の調製と培養

ラット腎臓メサングウム細胞は、石川らの方法¹¹⁾に従い、ラット単離糸球体を得、トリプシン処理にてボーマン嚢を除いた後、*in vitro*により培養し、cell line化したものを、国立病院医療センターより頂き用いた。

培養は10%ウシ胎児血清(GIBCO)を含むD MEM (日水)にて行い、3日おきに細胞を2.5%トリプシンによりはがし継代した。

(p) ラット腎臓メサングウム細胞の各種刺激

メサングウム細胞を刺激する際には、mediumを一旦除き、PBSにて洗浄後、mediumを0.1%ウシ血清アルブミンを含むD MEMに変えてから行った。

バソプレッシンによる刺激は、Cambridge Research ChemicalsのArg-バソプレッシン500nMを添加後、細胞を20分間培養することにより、TNFによる刺激は、大日本製薬より頂いたヒトリコンビナントTNF1,000units/mlを添加後、細胞を24時間培養することにより行った。A23187刺激は、A23187を1 μ Mを添加した後、30分間培養した。

細胞の外からホスホリパーゼA₂を作用させる際には、この系に、グループI型およびII型酵素として、それぞれラット脾臓¹¹⁾およびラット血小板¹⁰⁾から常法により

精製したホスホリパーゼ A₂ を添加した。

刺激後のメサングウム細胞中のホスホリパーゼ A₂ を測定する際は、細胞を T150 のフラスコ (CORNING) にて培養し、刺激後、細胞をトリブシン処理によりはがし、ホモジナイジング・バッファーにより洗浄してから用いた。細胞の可溶性画分は、細胞をチップタイプのソニケーターにより破壊した後、4℃、100,000xg、1時間超遠心 (日立 RPS50-2 ローターを用いた。) することにより調製した。

メサングウム細胞が刺激に応じ、細胞外に放出するホスホリパーゼ A₂ 活性、プロスタグランジン E₂ 量を測定する際には、細胞を 12well のプレート (CORNING) にて培養し、刺激後、その培養上清を回収した。プロスタグランジン E₂ 産生量は、NEN のラジオイムノアッセイ・キットを用い、測定した。

(q) ラット腎臓メサングウム細胞に存在するホスホリパーゼ A₂ 活性の DEAE-5PW による分画

TSK・DEAE-5PW (φ75mmx7.5cm、東ソー) を島津製作所の LC7A・HPLC システムに接続し、filtrate 済みの 1mM EDTA を含む 20mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.4) により平衡化した。このカラムに、メサングウム細胞可溶性画分を filtrate してから、2ml アプライした。カラムを同一組成の緩衝液にて 15 分間洗浄した後、50 分

間かけて塩化ナトリウム濃度を1 Mまで上昇させ、カラムに吸着したタンパク質を溶出した。流速は0.5ml/minとし、分画は1fraction=1mlとした。

第3章 ラット腎臓ホスホリパーゼA₂の精製

3-1 序

さまざまな動物の種々の臓器、細胞からホスホリパーゼA₂が精製され、その性状が解析されている¹⁴⁾。その大部分が分子量14キログルトンを示し、一次構造解析の結果、2種類のアイソザイムに分類される。これらのアイソザイムは、古くから解析が進められてきた蛇毒由来のホスホリパーゼA₂の構造のホモロジー（ジスルフィド結合の位置）から、グループI型ホスホリパーゼA₂、グループII型ホスホリパーゼA₂と呼ばれる¹⁵⁾¹⁶⁾。グループI型酵素は、もともと、臓器の中で最もホスホリパーゼA₂活性が高い膵臓から精製され¹¹⁾¹⁷⁾⁻²⁰⁾、その後、胃²¹⁾²²⁾や十二指腸²³⁾にも見いだされたため、食物消化に関わる外分泌性酵素であると考えられてきた。しかし、現在では、肺²⁴⁾²⁵⁾膵臓²⁶⁾などでもその存在が見いだされ注目されている。一方、グループII型酵素は、私をはじめとして、さまざまなグループにより、炎症性滲出液¹⁶⁾²⁷⁾⁻³¹⁾³³⁾²²⁾⁻²⁶⁾や血小板³²⁾⁻³⁷⁾、好中球³⁸⁾から精製され、その酵素活性が炎症反応の進行に伴い上昇する³⁹⁾ことから、炎症の進展に関与すると考えられている。アジュバンド関節炎を惹起したラットの関節腔にグループII型酵素を投与すると、炎症反応を亢進するという報告もある⁴⁰⁾。現在にいたるまで、膵臓⁴¹⁾⁴²⁾、肝臓⁴³⁾、

小腸⁴⁴⁾などの臓器、精漿⁴⁵⁾からも精製されている。これら2種類の分子量14キロダルトンのホスホリパーゼA₂は、現在ではその遺伝子構造も解明され、いずれもが細胞外へ分泌されるためのシグナル配列を有する放出性の酵素であることがわかっている³¹⁾³⁶⁾⁴⁶⁾⁻⁵¹⁾。さらに、グループI型酵素はプロ配列を有しており、チモーゲンの形で細胞外に放出されると考えられる。

また、高性能液体クロマトグラフィー技術の進歩により、ここ数年間には、分子量14キロダルトンを示さず、グループI型、II型酵素のいずれのアイソザイムに属さないホスホリパーゼA₂の精製の報告がおこなわれるようになった。その中でも興味深いのは、当教室金はじめいくつかのグループによる、グリセロール2位にアラキドノイル基を有するグリセロリン脂質を選択的に加水分解するホスホリパーゼA₂の精製の報告である。Alonsoらは、ヒト好中球細胞質に存在するホスホリパーゼA₂は、アラキドン酸含有リン脂質を選択的に加水分解する性質を有することを見だし、この酵素こそ脂質性メディエーター産生に重要であると指摘した⁵²⁾。その後、ヒト⁵³⁾、ウサギ血小板⁵⁴⁾、マウス由来マクロファージ系細胞株RAW264.7⁵⁵⁾⁵⁶⁾、ヒト由来マクロファージ系細胞株U937⁵⁷⁾⁵⁸⁾より、アラキドン酸含有リン脂質を高選択的に加水分解するホスホリパーゼA₂は精製された。その結果、いずれの酵素源より精製されたものも、分子量90-110キロダルトンを示し(60キロダルトンと報告したグループ

もあるが、これを否定する報告がなされている⁵⁰⁾。)、活性発現に μ Mオーダーのカルシウムイオンを必要とし、カルシウムイオンの存在により可溶性画分から膜画分へ移行する性質を示す。

その他、新しいタイプのホスホリパーゼ A_2 の精製報告としては、R.W.Grossらのグループにより進められているプラズマローゲン型リン脂質(1-アルケニル-2-アシルグリセロリン脂質)を選択的に加水分解するホスホリパーゼ A_2 の精製がある。彼らは、ヒツジ血小板より活性発現に μ Mオーダーのカルシウムイオンを必要とする分子量30キログルトンを示す⁵⁹⁾、イヌ心臓より活性発現にカルシウムイオンを必要としない分子量40キログルトンを示す⁶⁰⁾、いずれもプラズマローゲン型リン脂質をよい基質とするホスホリパーゼ A_2 を精製した。興味深いことに、これら2つの酵素は、1-アシル型リン脂質であってもグリセロール2位にアラキドノイル基を有するリン脂質を、プラズマローゲン型リン脂質同様、よく加水分解した。

一方、腎臓は、前述したように、脂質性メディエーター産生の盛んな代表的な臓器であるが、ホスホリパーゼ A_2 活性が低く⁶¹⁾、腎臓に存在するホスホリパーゼ A_2 の解析は非常に遅れており、その精製の報告もなかった。そこで、まず、ラット腎臓を材料としたホスホリパーゼ A_2 の精製を試みた。

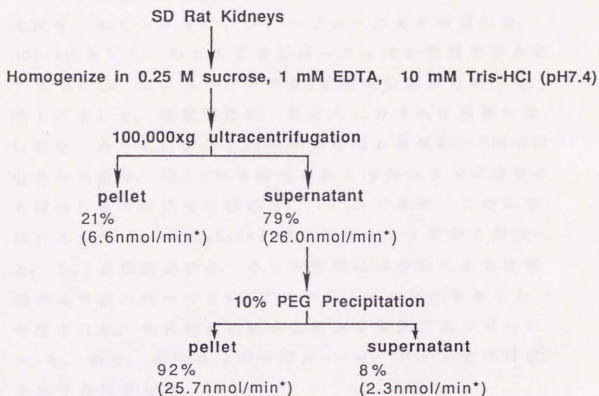
3-2 結果と考察

(a) ラット腎臓からの酵素源の調製

ラット腎臓20個をホモジナイズし、100,000xg超遠心により膜画分と可溶性画分を調製し、1-バルミトイル-2-アラキドノイルグリセロホスホエタノールアミンを基質として用いホスホリパーゼA₂活性を測定したところ、酵素活性の約80%は、可溶性画分に回収された。この可溶性画分に、ポリエチレングリコールを加えタンパク質を沈澱させたところ、ポリエチレングリコール濃度5%では酵素活性の約60%しか沈澱しなかったが、10%において酵素活性の90%以上が沈澱した。

以上の結果から、ラット腎臓に存在するホスホリパーゼA₂の大部分は、可溶性画分10%ポリエチレングリコール沈澱に回収されと考えられた。そこで、以下この沈澱を酵素源とし、ホスホリパーゼA₂の精製を行った。

Preparation of Enzyme Source



* Phospholipase A2 Activity
recovered from 20 kidneys

(b) D E A Eセルロースによるラット腎臓ホスホリ
バーゼ A₂活性の分画

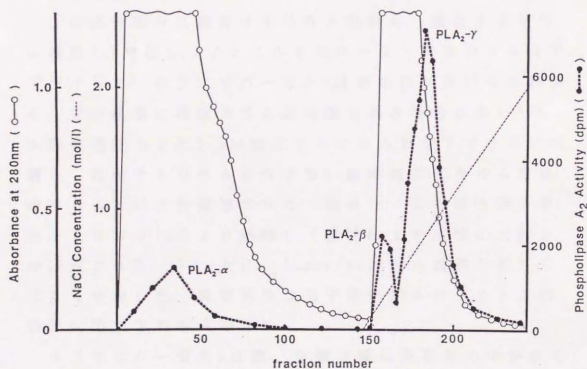
ラット腎臓可溶性画分の10%ポリエチレングリコール沈澱を、ホモジナイジングバッファーにより可溶化後、pH7.4において、D E A Eセルロースイオン交換カラムにアブライシ、ホスホリバーゼ A₂活性を分画した結果を、図1に示した。酵素活性は、D E A Eカラムに吸着しない画分、カラムに吸着し塩化ナトリウム濃度約0.2Mで溶出される画分、約0.6Mで溶出される画分の3つに分かれて溶出した(総活性比は約3: 1: 9であり、この比率はいくつかのpreparationを用いても大きく変わらなかった。)。この結果から、ラット腎臓には少なくとも3種類のホスホリバーゼ A₂のアイソザイムが存在することが予想された。それぞれの画分に存在するホスホリバーゼ A₂を、順に、ホスホリバーゼ A₂- α 、 β 、 γ と名付け、それぞれ精製した。

1つの臓器あるいは細胞から、2種類以上のホスホリバーゼ A₂のアイソザイムを見だし、精製したとする報告としては、これまでに、ラット脾臓^{26) 41)}およびウサギ血小板^{26) 54)}を酵素源とした報告が知られる。ラット脾臓には分子量14キログルトン・グループI型酵素およびII型酵素、ウサギ血小板には分子量14キログルトン・グループII型酵素および分子量88キログルトンのアラキドン酸含有リン脂質をよい基質とする酵素が存在してい

た。また、最近、当教室村上は、肥満細胞には3種類のホスホリパーゼA₂のアイソザイムが存在することを見だしている^{6,2)}。

図1 DEAEセルロースによるラット腎臓ホスホリパーゼA₂活性の分画

Elution Profiles of DEAE Cellulose Ion Exchange Chromatography



	PLA ₂ -α	PLA ₂ -β	PLA ₂ -γ
total activity (nmol/min)	3.2	0.98	8.4

(c) ホスホリパーゼ $A_2-\alpha$ の精製

まず、ホスホリパーゼ $A_2-\alpha$ を精製するために、DEAEセルロースで分画したホスホリパーゼ $A_2-\alpha$ 画分を、pH7.4において、CMセファロース・カラムにアブライした。酵素活性の大部分がカラムに吸着せずに溶出された(図2)。ホスホリパーゼ A_2 活性は透析膜に吸着しやすいため、ホモジナイジングバッファーのままCMカラムによる分離を行った。

この活性画分に塩化ナトリウムを加え、塩化ナトリウム濃度1.5Mとし、フェニルトヨバル・疎水カラムにアブライした。ホスホリパーゼ A_2 は疎水性が高いものが多く、その精製に疎水カラムが有効である場合が多い^{6,3)}。本酵素活性もまた1.5M塩化ナトリウム存在下カラムに吸着し、塩化ナトリウムを含まない緩衝液にてカラムを洗浄することにより溶出された(図3)。この活性画分をセントリコン10により濃縮し(濃縮により活性の大部分が回収された。)、次に、Superose12ゲル濾過FPLCにより分画した。酵素活性は分子量約18キロダルトンの位置に溶出された(図4)。

ホスホリパーゼ A_2 は酸、有機溶媒に安定なものも多く、その精製に逆相HPLCが用いられることが多い^{6,4)}。本酵素活性もまた、酸を含むアセトニトリル-水混液中においてもほとんど失活しなかったので、精製の最後に逆相HPLCを用いた。逆相HPLCのカラムとしては、

フェニル基をリガンドとしたフェニル 5PW-RP を使用した。酵素活性は、アセトニトリル濃度約 30% にて、多くの夾雑タンパク質と一緒に溶出された (図 5)。そこで次に、アセトニトリル濃度勾配の傾斜をやや緩くして、同じカラムを用いリクロマトグラフィーを行った。その結果、酵素活性は主要なタンパク質の溶出ピークの 1 つと重なって溶出された (図 6)。

以上の操作により、ホスホリパーゼ $A_2-\alpha$ は SDS-PAGE 上単一バンド、約 2 万倍に精製された (表 1)。分子量は約 14 キロダルトンであった (図 7)。

表 1

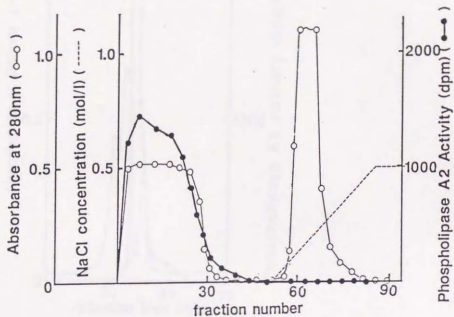
Purification of Rat Kidney Phospholipase $A_2-\alpha$

	total protein (mg)	total activity (nmol/min)	yield (%)	specific activity (pmol/min/mg)	purification (fold)
DEAE cellulose	1719	3.2	100	1.8	1
CM Sepharose	980	6.4	200	6.5	3.6
Phenyl Toyopearl	184	2.15	67	11.7	6.5
Superose 12	16.5	1.23	38	74.5	41.4
Phenyl 5PW-RP	0.008	0.29	9	3.6×10^4	2.0×10^4
(2nd)	0.002	0.13	4	6.5×10^4	3.6×10^4

Elution Profiles of Column Chromatography of Rat Kidney Phospholipase A₂-α

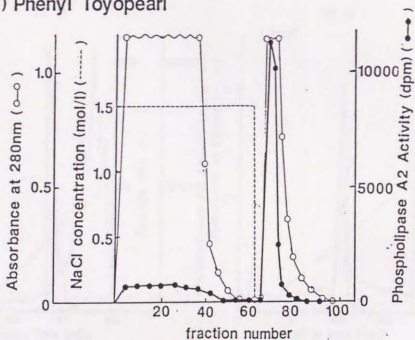
A) CM Sepharose

Figure 2



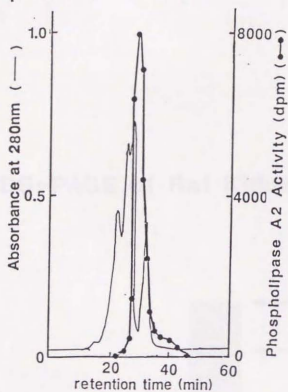
B) Phenyl Toyopearl

Figure 3



C) Superose 12

图 4



D) TSK Phenyl-5PW RP

图 5

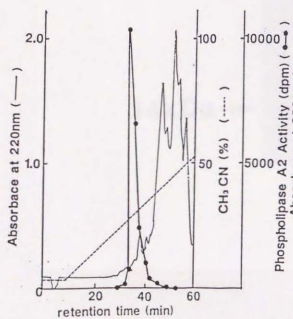
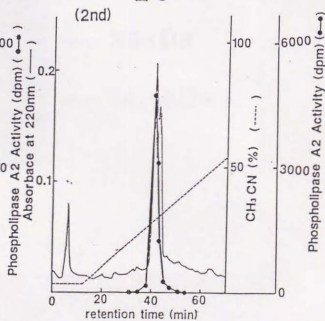
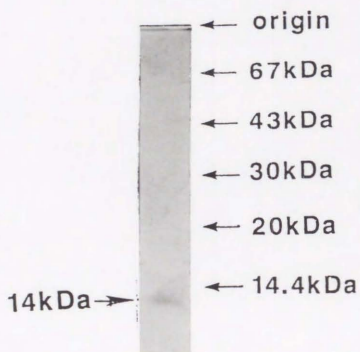


图 6



SDS-PAGE of Rat Kidney PLA₂ - α



(d) ホスホリパーゼ $A_2-\beta$ の精製

次に、ホスホリパーゼ $A_2-\beta$ を精製した。

D E A E セルロースで分画したホスホリパーゼ $A_2-\beta$ 画分に、まず、塩化ナトリウムを加え、塩化ナトリウム濃度 1 M とし、フェニルトヨパール・疎水カラムにアブライした。ホスホリパーゼ $A_2-\beta$ は α 同様、高塩濃度存在下カラムに吸着し、塩化ナトリウムを含まない緩衝液にてカラムを洗浄することにより溶出された (図 8)。

この活性画分を次に、pH 7.4 において D E A E セファセル・カラムにアブライした。酵素活性はカラムに吸着し、塩化ナトリウム濃度を上昇させることにより、塩化ナトリウム濃度約 0.2-0.3 M にて溶出された (図 9)。

この活性画分を、さらにセントリコン 10 により濃縮し (β も α 同様、この濃縮により活性の大部分が回収された。)、これに固形硫酸を加え、硫酸濃度 2 M とした。次に、この試料をエーテル 5 P W・H P L C にアブライした。本カラムは、比較的疎水性の弱い疎水クロマトグラフィーである。ホスホリパーゼ A_2 活性は硫酸存在下カラムに吸着し、硫酸濃度を減少させていくと、硫酸を含まない緩衝液で溶出された (図 10)。

ホスホリパーゼ $A_2-\beta$ の酵素活性もまた、 α 同様、酸を含むアセトニトリル-水混液中においてもほとんど失活しなかったので、精製の最後に逆相 H P L C を用いた。逆相 H P L C のカラムとしては、オクチル基をリガンド

としたCapcell PAK C8カラムを使用した。この逆相HPLC用のカラムは、フェニル5PW-RPよりキャパシティが大きい。その結果、酵素活性は、アセトニトリル濃度約35%にて、タンパク質の溶出ピークの1つと重なって溶出された(図11)。

以上の操作により、ホスホリパーゼ $A_2-\beta$ はSDS-PAGE上単一バンド、約8万倍に精製された(表2)。分子量は約14キロダルトンであった(図12)。

表 2

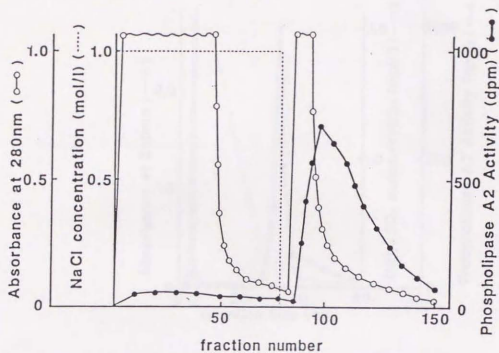
Purification of Rat Kidney Phospholipase $A_2-\beta$

	total protein (mg)	total activity (nmol/min)	yield (%)	specific activity (pmol/min/mg)	purification (fold)
DEAE cellulose	458	0.98	100	2.1	1
Phenyl Toyopearl	114	0.75	77	6.6	3.1
DEAE Sephacel	36.3	0.44	45	10.2	4.9
TSK Ether-5PW	5.5	0.32	33	58.8	28.0
RP-HPLC	0.001	0.17	17	1.7×10^5	8.0×10^4

Elution Profiles of Column Chromatography of Rat Kidney Phospholipase A₂-β

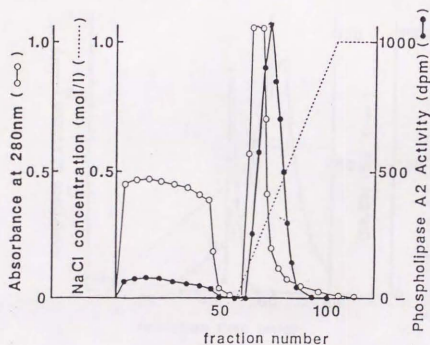
A) Phenyl Toyopearl

Fig. 8



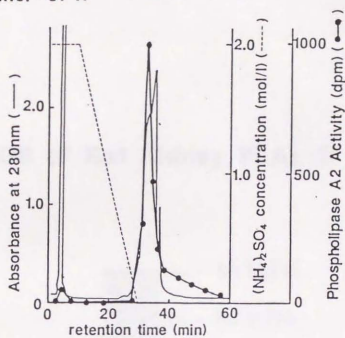
B) DEAE Sephacel

Fig. 9



C) TSK Ether-5PW

图 10



D) Reversed-phase HPLC (C8)

图 11

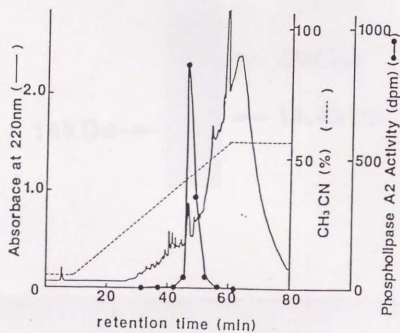
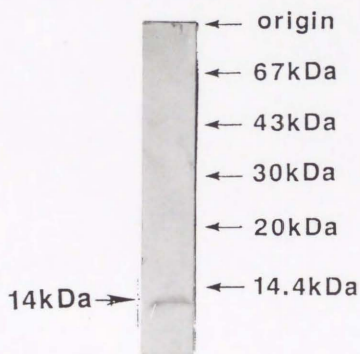


图 12

SDS-PAGE of Rat Kidney PLA₂-β



(e) ホスホリパーゼ $A_2-\alpha$ 、 β の免疫化学的解析

(3-1) でも述べたように、分子量が14キログルトンであるホスホリパーゼ A_2 には、これまでにグループ I 型および II 型と呼ばれる2種類のアイソザイムが存在することが知られている。次に、これら2種類のアイソザイムに対する抗体と、ホスホリパーゼ $A_2-\alpha$ 、 β との反応性を検討した。

その結果、ホスホリパーゼ $A_2-\alpha$ は、図13に示すように、グループ I 型酵素に対するポリクローナル抗体により、ホスホリパーゼ $A_2-\beta$ は、図14に示すように、グループ II 型酵素に対するポリクローナル抗体により、ほぼ完全に酵素活性が阻害された。酵素化学的性質も検討した(詳しい結果については後述する。)が、ホスホリパーゼ $A_2-\alpha$ 、 β の性質はそれぞれグループ I 型、II 型酵素と一致した。また、グループ II 型ホスホリパーゼ A_2 の特徴としてヘパリン高親和性があげられる^{63) 65)} が、D E A E セルロース・ホスホリパーゼ $A_2-\beta$ 画分中のホスホリパーゼ A_2 活性の大部分がヘパリン・セファロースに吸着した(図15)。以上の結果より、ラット腎臓より精製したホスホリパーゼ $A_2-\alpha$ 、 β は、それぞれグループ I 型ホスホリパーゼ A_2 およびグループ II 型ホスホリパーゼ A_2 であることが明らかとなった。

グループ I 型酵素は、膵臓、胃や十二指腸に見いだされ、食物消化に関わると考えられてきたが、最近その存

在が見いだされた肺、脾臓に加え、本研究において、腎臓にもその存在が見いだされた。食物消化以外に、生体内で重要な機能を果たしている可能性が示唆された。

グループⅡ型酵素が腎臓に存在するとする報告も本研究まで見られなかったが、Kramerらは、ノーザン・ブロットティングにより、グループⅡ型酵素のmRNAが腎臓に存在すると見いだしている³⁶⁾。本研究により、タンパク質として確かにグループⅡ型酵素が存在することが明らかとなった。グループⅡ型酵素は炎症反応進行に関与すると考えられてきたが、最近当教室では、ある種の臓器傷害において、グループⅡ型酵素が誘導され、臓器のリン脂質分解を亢進することを見いだした。すなわち、心臓に虚血をおこしたり⁶⁶⁾、肝臓に四塩化炭素により傷害を与えたりした際に⁶⁷⁾、ホスファチジルエタノールアミンの分解が亢進すること、さらに、この亢進が、グループⅡ型酵素に対する抗体によりおさえられることを観察した。腎臓においても、何らかの傷害にともない、さらにホスホリパーゼA₂-βの活性が上昇する可能性も考えられる。

(3-1)でも述べたように、グループⅠ型酵素、グループⅡ型酵素はいずれも細胞外に分泌されるためのシグナルペプチドを有している。いくつかの細胞系において刺激に応じて細胞外に放出されることも見いだされている^{35) 68) - 71)}。ホスホリパーゼA₂-α、βはいずれも一旦細胞外に放出されてから働くと考えられる。

图 13

Immunoreactivity of Rat Kidney Phospholipase A2- α
with anti-Rat 14kDa Phospholipase A2 Polyclonal Antibody

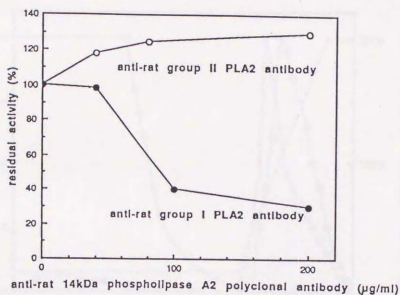


图 14

Immunoreactivity of Rat Kidney Phospholipase A2- β
with anti-Rat 14kDa Phospholipase A2 Polyclonal Antibody

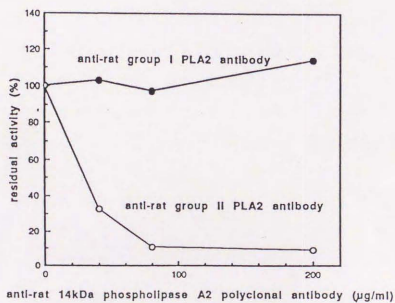
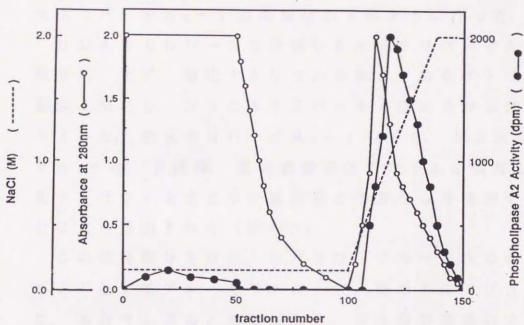


Fig. 15

Elution Profiles of Heparin-Sepharose Chromatography of Rat Kidney Phospholipase A2- β



(f) ホスホリパーゼ $A_2-\gamma$ の精製

一方、ラット腎臓に最も多く存在すると考えられるホスホリパーゼ $A_2-\gamma$ の精製は以下のように行った。

DEAEセルロースで分画したホスホリパーゼ $A_2-\gamma$ 画分に、まず、塩化ナトリウムを加え、塩化ナトリウム濃度 1 M とし、フェニルトヨバール・疎水カラムにアブライした。ホスホリパーゼ $A_2-\gamma$ もまた、ホスホリパーゼ $A_2-\alpha$ 、 β 同様、高塩濃度存在下カラムに吸着し、塩化ナトリウムを含まない緩衝液にてカラムを洗浄することにより溶出された (図 16)。

この活性画分を次に、シバクロンブルー F 3 GA をリガンドとするブルーセファロース・カラムにアブライした。本カラムはもともと NAD、NADP 酵素のアフィニティクロマトグラフィー用のゲルとして開発されたものであるが、その後、さまざまな酵素の精製に用いられており、ラット肝臓ミトコンドリアからのホスホリパーゼ A_2 の精製にも使われている^{7,21}。酵素活性はカラムに吸着し、塩化ナトリウム濃度を上昇させることにより、タンパク質のピークにやや遅れて、塩化ナトリウム濃度約 0.6 M 付近にブロードなピークとして溶出された (図 17)。

この活性画分を、さらにセントリコン 10 により濃縮し (γ も、この濃縮により活性の大部分が回収された。)、Superose 12 ゲル濾過 FPLC により分画した。本酵素は

Superoseのゲル（アガロースでできている。）とアフィニティを有しており、大部分のタンパク質が溶出された後、タンパク質の溶出ピークの1つと重なって溶出された（図18）。本カラムは溶出にアセトニトリルを含む溶出液も使用できる。アセトニトリルを含む溶出液を用いると、含まない溶出液で溶出を行うと実際の分子量より遅れて溶出されるタンパク質も、比較的实际の分子量どおり溶出される（例えば、ホスホリパーゼA₂-βはこのような性質を示した。）。しかし、本酵素はかなりアフィニティが強く、このような条件においてもかなり遅れて溶出された。

以上の操作により、ホスホリパーゼA₂-γは、SDS-PAGE上単一バンド、DEAEセルロースで分画した後の約1000倍、腎臓可溶性画分から約8500倍に精製された（表3）。分子量は約30キログルトンであった（図19）。

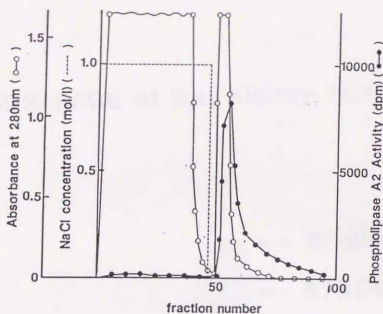
表3 Purification of Rat Kidney Phospholipase A₂-γ

	total protein (mg)	total activity (nmol/mln)	yield (%)	specific activity (pmol/min/mg)	purification (fold)
crude	7425	26.0	100	3.5	1
10%PEG ppt.	4914	25.7	99	5.3	1.5
DEAE cellulose	266	8.4	33 (100)	31.6	9.0 (1.0)
Phenyl Toyopearl	45	4.5	17 (51)	100	28.6 (4.8)
Blue Sepharose	7.4	1.9	7.3 (22)	257	73.4 (8.2)
Superose12	0.02	0.6	2.3 (7.0)	30000	8571 (952)

Elution Profiles of Column Chromatography of Rat Kidney Phospholipase A₂-γ

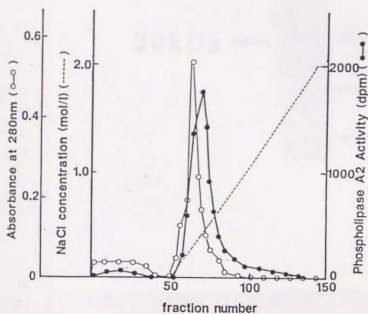
A) Phenyl Toyopearl

Fig 16



B) Blue Sepharose

Fig 17



C) Superose 12

Fig 18

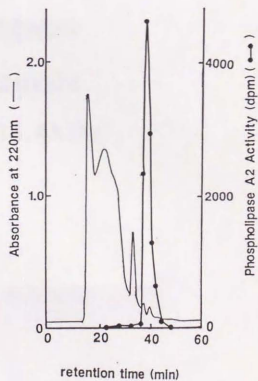
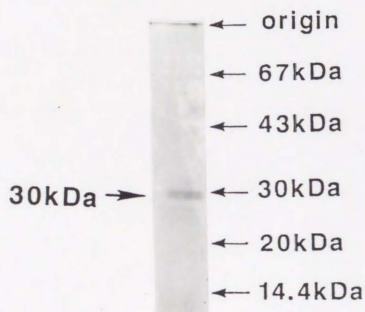


图 19

SDS-PAGE of Rat Kidney PLA₂- γ



(8) 精製にともなうホスホリバーゼ $A_2-\gamma$ の分子量
の変化

精製ホスホリバーゼ $A_2-\gamma$ は、SDS-PAGE 上分子
量約30キロダルトンを示したが、精製段階のちがいに
より、ゲル濾過上異なる挙動を示した。ブルーセファロ
ースで分画する前の、DEAEセルロースで分画した後、
あるいはフェニルトヨバールで分画した後の酵素活性画
分を、セファデックス G75によりゲル濾過すると、図20
Aに示すように、酵素活性は分子量約60キロダルトンの
位置に溶出された。しかし、ブルーセファロースで分画
した後の酵素活性画分をゲル濾過すると、図20Bに示す
ように酵素活性はかなり低分子量に溶出され、精製ホス
ホリバーゼ $A_2-\gamma$ と同様の挙動を示した（本酵素はセフ
アデックスのゲルにも吸着性を示した）。また、ブル
ーセファロースで分画する前の酵素活性画分を、1%コ
ール酸ナトリウム存在下ゲル濾過すると、ブルーセファ
ロースで分画した後の画分をゲル濾過した場合と同様、
酵素活性はかなり低分子量に溶出された（図20C）。同
様の結果は、2M塩化ナトリウム存在下のゲル濾過にお
いても観察された。

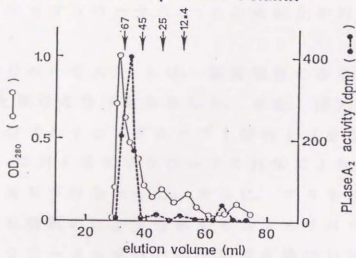
以上の結果は、ホスホリバーゼ $A_2-\gamma$ が腎臓内におい
て、他の分子と複合体を形成している可能性を示唆して
いる。この複合体は界面活性剤や高濃度の塩により解離
するような疎水性結合により形成されていると考えられ

る。Wangらは、リンパ球のホスホリパーゼCを精製する過程において、リンパ球のホスホリパーゼCがある種のGTP結合タンパク質と結合しており、界面活性剤存在下ゲル濾過することによりこの結合が解離することを見いだしている⁷³⁾。いくつかの細胞系において、ホスホリパーゼA₂活性がGTP結合タンパク質により調節されているという可能性も示唆されている⁷⁴⁾⁻⁸⁶⁾。ホスホリパーゼA₂- γ もある種のGTP結合タンパク質とカップルしている可能性も考えられる。しかし、私が用いたホスホリパーゼA₂のアッセイ系では、GTP- γ SによるホスホリパーゼA₂活性の上昇あるいは減少は見られず、ホスホリパーゼA₂- γ がGTP結合タンパク質と結合している可能性を示唆するような結果は得られなかった。

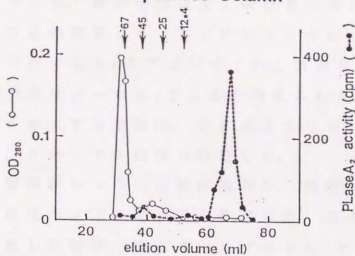
現在のところ、ホスホリパーゼA₂- γ が、どのような分子と複合体を形成しうるかについては、全く知見を得ていない。ここで述べたホスホリパーゼA₂の複合体形成については今後検討すべき課題である。

Elution Profiles of Sephadex G-75 Gel Filtration Chromatography

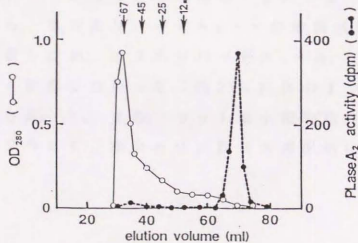
A) Before Blue Sepharose Column



B) After Blue Sepharose Column



C) Before Blue Sepharose Column
(in the Presence of 1% Cholate)



(h) ホスホリパーゼ $A_2-\gamma$ の免疫化学的解析

ホスホリパーゼ $A_2-\gamma$ は、従来報告のあるホスホリパーゼ A_2 と異なる分子量を示した。また、図 21 に示すように、14 キロダルトン・グループ I 型および II 型ホスホリパーゼ A_2 に対するポリクローナル抗体により、その活性は全く影響をうけなかった。さらに、アラキドン酸含有リン脂質を選択的に加水分解するホスホリパーゼ A_2 に対するモノクローナル抗体との反応性も検討したが、この抗体によっても、酵素活性は全く吸収されなかった（図 22）。これらの結果より、ホスホリパーゼ $A_2-\gamma$ は既知のホスホリパーゼ A_2 のアイソザイムとは異なる新しいタイプのホスホリパーゼ A_2 であると考えられた。この点をさらに明らかにするために、次にホスホリパーゼ $A_2-\gamma$ によるモノクローナル抗体を作製した。

部分精製酵素をマウスに脾内投与し、免疫後の脾細胞から抗体産生ハイブリドーマを作製した。スクリーニングを繰り返した結果、抗ホスホリパーゼ $A_2-\gamma$ 抗体産生株 4 株を得た。サブクラスを検討したところ、いずれのハイブリドーマが産生する抗体も IgM であった。いずれの抗体も、ホスホリパーゼ $A_2-\gamma$ の酵素活性を用量依存的に吸収したが、ホスホリパーゼ $A_2-\alpha$ 、 β の酵素活性には全く影響しなかった（図 23 に抗体の 1 つを用いた結果を示した。）。また、ラット血小板細胞質より部分精製したアラキドン酸含有リン脂質を選択的に加水分解

するホスホリパーゼ A₂ の酵素活性も全く吸収せず、ホスホリパーゼ A₂- γ は、免疫化学的に全く新しいホスホリパーゼ A₂ のアイソザイムであることがわかった。

このモノクローナル抗体を用い、ホスホリパーゼ A₂- γ の部分精製標品のイムノプロットティングを行ったところ、図 24 に示すように、確かに分子量約 30 キロダルトンのバンドが検出された。この結果より、分子量 30 キロダルトンのタンパク質が、確かに酵素活性を担うタンパク質であることが示された。また、30 キロダルトンのバンドの他に、分子量 60 キロダルトン付近にもバンドが検出された。(g) で論じた酵素と別の分子の複合体、あるいは酵素の二量体である可能性も考えられる。



图 21

Immunoreactivity of Rat Kidney Phospholipase A2- γ
with anti-Rat 14kDa Phospholipase A2 Polyclonal Antibody

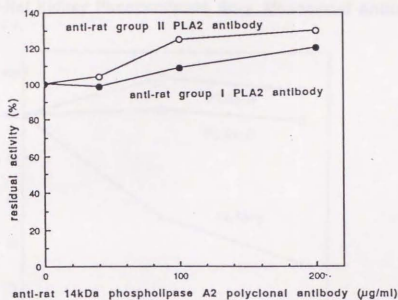
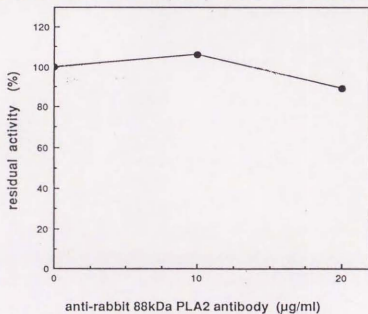
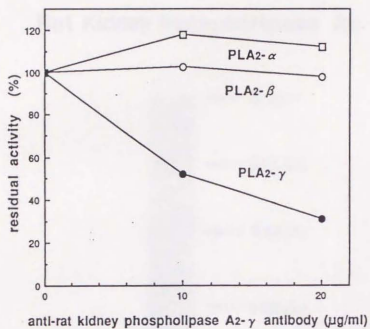


图 22

Absorption of Rat Kidney Phospholipase A2- γ
with anti-Rabbit 88kDa Phospholipase A2 Monoclonal Antibody

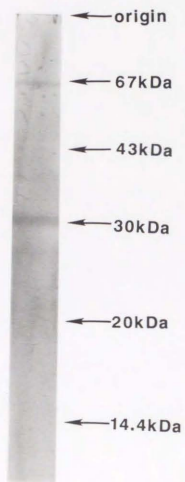


Absorption of Phospholipase A₂ Activity with
anti-Rat Kidney Phospholipase A₂- γ Monoclonal Antibody



Immunoblotting of

Rat Kidney Phospholipase A₂ - γ



(i) ホスホリパーゼ A₂- γ の酵素化学的解析

新しいタイプのホスホリパーゼ A₂ のアイソザイム、ホスホリパーゼ A₂- γ の酵素化学的性質について最後に検討した。表 4 に、その性質をまとめ、ラット腎臓から精製したもう 2 つのアイソザイムと比較したものを示した。

表 4

Enzymatic Properties of Rat Kidney Phospholipases A₂

	α	β	γ
Molecular Weight	14kDa	14kDa	30kDa
Ca ²⁺ Requirement	10 ⁻³ M	10 ⁻³ M	10 ⁻⁴ M
Substrate Specificity	PE, PS, PC	PE, PS>PC	PE, PS>PC
Optimum pH	8~10	8~10	7~10
Inhibitors	pBPB DTT mepacrine	pBPB DTT mepacrine	pBPB DTT mepacrine

ホスホリパーゼ $A_2-\gamma$ は、ホスホリパーゼ $A_2-\alpha$ 、 β 同様、活性発現にカルシウムイオンを必要とし、EDTA 存在下その活性は完全に阻害された (図 25)。しかし、そのカルシウム要求性は、他の 2 つの酵素に比べ、1 オーダーほど低く、 $10^{-4}M$ で 50% 以上の活性が発現された。前述したように、ホスホリパーゼ $A_2-\alpha$ 、 β は細胞外で働くと考えられるが、ホスホリパーゼ $A_2-\gamma$ については、細胞外に放出される酵素か、細胞内において機能する酵素かは、現在のところ不明である。最近、いくつかの細胞、臓器から、カルシウム要求性が低く、細胞内濃度と考えられる $10^{-6}M$ 程度で活性を発現するホスホリパーゼ A_2 が精製され、注目されている⁵³⁾⁻⁶⁰⁾。これに対し、ホスホリパーゼ $A_2-\gamma$ は、カルシウム要求性がホスホリパーゼ $A_2-\alpha$ 、 β と比較したら低いといっても、 $10^{-6}M$ 程度のカルシウムイオン濃度では、ほとんど活性を発現しない。この酵素が細胞内で機能するためには、カルシウム要求性を減少させる何らかのファクターが必要であると考えられる。

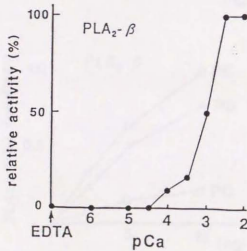
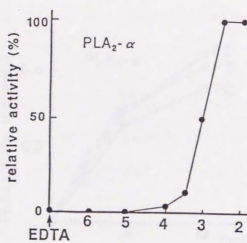
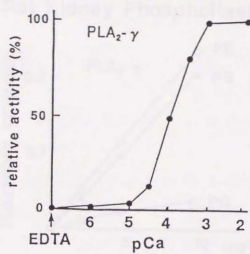
図 26 は、ホスホリパーゼ $A_2-\gamma$ の基質特異性を、ホスホリパーゼ $A_2-\alpha$ 、 β と比較した結果を示している。ホスホリパーゼ $A_2-\gamma$ は、ホスホリパーゼ $A_2-\alpha$ がホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルコリンいずれをも良い基質とするのに対し、ホスホリパーゼ $A_2-\beta$ 同様、ホスファチジルコリンに比べ、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチ

ジルセリンを良く加水分解した。また、データは示さないが、いずれの酵素も、グリセロール 2 位にアラキドノイル基をもつリン脂質、リノレオイル基をもつリン脂質を同様に加水分解した。

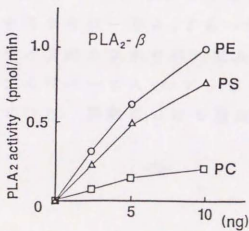
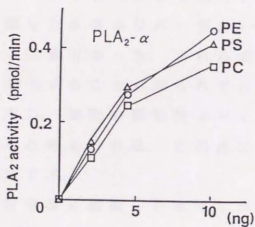
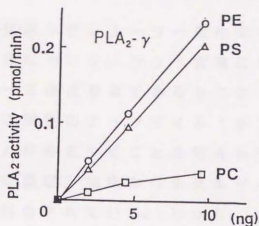
阻害剤の効果も検討した。ホスホリバーゼ $A_2-\gamma$ は、ホスホリバーゼ $A_2-\alpha$ 、 β 同様、活性ヒスチジン残基阻害剤である p -プロモフェナシルプロマイド (pBPB) や、ジスルフィド結合を還元するジチオスレイトール (DTT) により阻害されたが、チオール基修飾剤である N -エチルマレイミド (NEM) やヨードアセタミド、活性セリン残基修飾剤であるフェニルメタンスルホニルフルオリド (PMSF) やジイソプロピルフルオロリン酸 (DFP) には阻害されなかった。類似した活性部位の構造を有する可能性が考えられた。また、広くホスホリバーゼ A_2 の阻害剤としているメバクリンにもホスホリバーゼ $A_2-\gamma$ は阻害されたが、グループ II 型ホスホリバーゼ A_2 の特異的阻害剤として開発された CX-1 は、グループ II 型酵素 (ホスホリバーゼ $A_2-\beta$) を阻害する濃度 (25 ng/ml) において、ホスホリバーゼ $A_2-\gamma$ の活性には影響しなかった。

25

Ca^{2+} Requirement of Rat Kidney Phospholipases A₂



Substrate Specificity of Rat Kidney Phospholipases A₂



3-3 まとめと考察

腎臓は脂質性メディエーター産生の盛んな臓器である。私は、本研究において、ラット腎臓には、この脂質性メディエーターの律速酵素であるホスホリパーゼA₂として、少なくとも3種類のアイソザイム（ホスホリパーゼA₂- α 、 β 、 γ ）が存在することを明らかにした。

さまざまな臓器、細胞からホスホリパーゼA₂の精製が試みられ、報告されている。しかし、蛋白化学的および免疫化学的解析により、その大部分が14キログルトン・グループI型あるいはII型ホスホリパーゼA₂のアイソザイムに属することが明らかにされている。私が、ラット腎臓より精製したホスホリパーゼA₂- α 、 β もこのグループに属する酵素であった。これらの酵素は刺激に応じて細胞外に放出することが知られており、おそらく細胞の外から作用し、細胞の脂質性メディエーターの産生を亢進していると考えられる。この点については、第4章において検討する。

しかし、腎臓から精製したもう1つのホスホリパーゼA₂- γ は、明らかにこれらとは異なる酵素であり、新しいタイプのホスホリパーゼA₂であった。ラット腎臓には、この新しいタイプのホスホリパーゼA₂- γ の活性が、私がいいたホスホリパーゼA₂のアッセイ系で見える限り最も多く存在していた。腎臓における脂質性メディエーター

の産生には、この酵素が最も寄与していると考えられる。

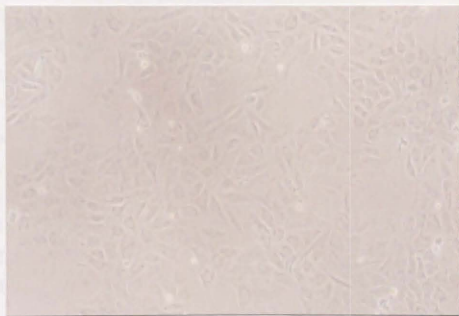
ごく最近、Gronichらは、ラット腎臓より110キロダルトンのホスホリパーゼA₂を精製したと報告した⁸⁷⁾。彼らによると、この酵素はアラキドン酸含有リン脂質を良い基質とし、10⁻⁶M程度のカルシウム濃度で十分な活性を発現するという。ラット腎臓にはこの分子量110キロダルトンの酵素が最も多く存在するとしている。この性質は、当教室においてウサギ血小板細胞質などから見いだしているアラキドン酸含有リン脂質をよく加水分解する酵素の性質とよく一致している⁵⁴⁾。しかし、ウサギ血小板細胞質ホスホリパーゼA₂に対するモノクローナル抗体によって、ラット腎臓中のホスホリパーゼA₂活性はほとんど吸収されなかった。また、ウサギ腎臓中にも、この抗体により吸収されるようなホスホリパーゼA₂活性は見られなかった¹²⁾。何故、彼らが見いだしたホスホリパーゼA₂が検出できないのかについては、現在のところ不明である。

また、1990年の国際プロスタグランジン会議、アメリカ腎臓学会において、Morrisonらは、ウサギ腎臓皮質から、ホスファチジルエタノールアミンに選択的に作用するホスホリパーゼA₂を精製したと報告した⁸⁸⁾⁸⁹⁾。この酵素は、活性発現にmMオーダーのカルシウムイオンを必要とし、分子量22キロダルトンを示し二量体を形成するという。この酵素は、ウサギ腎臓におけるホスホリパーゼA₂- γ である可能性も考えられる。

第4章 ラット腎臓メサンギウム細胞におけるホスホリ バーゼ A_2 の機能の解析

4-1 序

この章では、腎臓より精製し、その性状を解析したホスホリバーゼ A_2 - α 、 β 、 γ の腎臓内における機能を明らかにするために、腎臓由来培養細胞を用い、細胞レベルでの解析を行った。腎臓由来培養細胞としては、メサンギウム細胞を用いた（下写真）。



メサングウム細胞は、腎糸球体に存在する細胞である。以前は単なる糸球体係蹄の支持組織として考えられてきたが、近年種々の物質に反応して収縮することや、細胞増殖反応を示すこと、あるいはメサングウム基質を産生することなどが知られてきており、糸球体濾過機能の調節や腎炎の反応の場としてこの細胞が重要であると考えられるようになった⁹⁸⁾。メサングウム細胞は、刺激のない状態においてもプロスタグランジン(ラット培養メサングウム細胞ではプロスタグランジンE₂、ヒト培養メサングウム細胞ではプロスタグランジンI₂の産生が多いとされる⁹¹⁾)を産生し、メサングウム細胞に収縮や増殖をもたらすような、アンジオテンシンII、バソプレッシンなどの血管作動性ホルモンや、インターロイキン1、TNF、LPS、補体といった炎症性の刺激に反応しプロスタグランジンの産生がさらに亢進することが知られている⁹²⁾。また、プロスタグランジンに加え、メサングウム細胞はPAFも産生することが報告されている⁹³⁾。そして、これら産生された脂質性メディエーターは、メサングウム細胞自身にも作用し、その反応を修飾する可能性が示唆されている。

近年、メサングウム細胞の脂質性メディエーター産生に関与するホスホリパーゼA₂の活性調節機構についても、いくつかのグループにより解析が進められ、GTP結合タンパク質⁸⁵⁾⁸⁶⁾、カルモジュリン⁹⁴⁾、プロテインキナーゼC⁹⁵⁾など、さまざまな機構により調節される可能性

が報告されはじめている。しかし、いかなるホスホリパーゼ A_2 がその反応に関与するかについての報告はなかった。私は、精製したホスホリパーゼ $A_2 - \alpha$ 、 β 、 γ ならびにそれぞれに対する抗体を用い、この点を中心に解析を行った。

4-2 結果と考察

(a) ラット腎臓メサンギウム細胞のホスホリパーゼ A₂ 活性

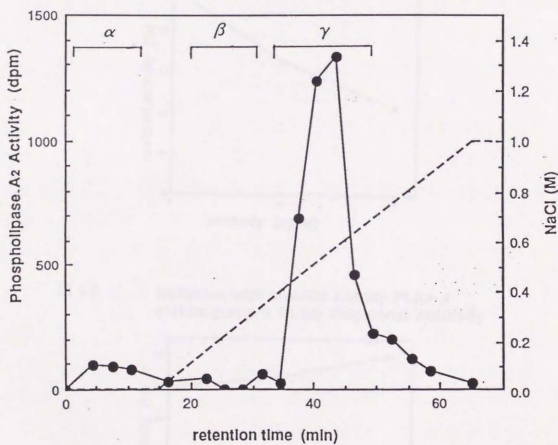
ラット腎臓メサンギウム細胞可溶性画分を調製し、1- β -アラキドノイルグリセロホスホエタノールアミンを基質として用い、ホスホリパーゼ A₂ 活性を測定したところ、 10^{-6} 個の細胞あたり $9.9 \pm 1.1 \text{ pmol/min}$ の酵素活性が検出された。この酵素活性を、DEAEイオン交換カラムに分画した結果を、図27に示した。酵素活性は、pH7.4においてカラムに吸着し、塩化ナトリウム濃度を上昇させることにより、塩化ナトリウム濃度約0.6Mにて溶出された。このカラム上の挙動は、ホスホリパーゼ A₂- γ と一致した。このDEAEカラムに吸着したホスホリパーゼ A₂ 活性は、ホスホリパーゼ A₂- γ に対するモノクローナル抗体により吸収された(図28)が、ホスホリパーゼ A₂- β の酵素活性を阻害したグルーブII型酵素に対するポリクローナル抗体には全く影響をうけなかった(図29)。また、アラキドン酸含有リン脂質を選択的に加水分解するホスホリパーゼ A₂ に対するモノクローナル抗体にも、その活性は全く吸収されなかった。

以上の結果から、ラット腎臓メサンギウム細胞は、ホスホリパーゼ A₂ 活性として、おもにホスホリパーゼ A₂

— γ を発現していることがわかった。

図 27

Elution Profiles of DEAE column of Phospholipase A₂ Activity of Mesangial Cells



Immunoreactivity of PLA₂ Activity of Rat Mesangial Cells
with anti-Rat Kidney PLA₂- β & γ Antibodies

图 28

Absorption with anti-Rat Kidney
PLA₂- γ Monoclonal Antibody

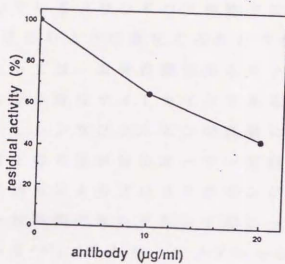
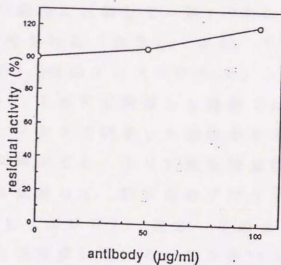


图 29

Inhibition with anti-Rat Kidney PLA₂- β
(14kDa-group II PLA₂) Polyclonal Antibody



(b) 細胞外からの刺激に伴うメサングウム細胞ホスホリパーゼ A₂ 活性の変化

次に、細胞外からの刺激に応答し、プロスタグランジン産生が亢進しているメサングウム細胞では、ホスホリパーゼ A₂ 活性はどのように変化するかどうかについて検討した。刺激としては、血管作動性ホルモンであるバソプレッシンおよび炎症性サイトカインである T N F を用いた。バソプレッシンなどホルモンの刺激によるプロスタグランジン産生の亢進が分のオーダーで観察されるのに対し、T N F 刺激によるプロスタグランジン産生の亢進は刺激後 4 - 6 時間の遅れを伴って起こってくることが報告されている^{9,6)}。そこで、バソプレッシンによる刺激時間は 20 分間、T N F による刺激時間は 24 時間に設定した。

バソプレッシンでメサングウム細胞を 20 分間刺激すると、刺激のない場合に比較して、約 1.7 倍のプロスタグランジン E₂ が産生された (表 5)。また、T N F で 24 時間刺激すると、約 1.9 倍のプロスタグランジン E₂ が産生された (表 6 A)。T N F で刺激した細胞では刺激応答性も増しており、T N F で刺激した細胞を洗浄した後、さらに A23187 で刺激すると、T N F 無処理細胞を A23187 で刺激した場合に比較して、約 3 倍のプロスタグランジン E₂ が産生された (表 6 B)。次に、このように脂質性メディーター産生が亢進しているメサングウム細胞の可溶

性画分中のホスホリパーゼ A₂ 活性を測定した。ホスホリパーゼ A₂ 活性は、無処理の細胞に比べ、バソプレッシン刺激により約 2 倍に、TNF 刺激により約 4 倍に上昇しており、この活性の上昇はプロスタグランジン産生の亢進とカップルしていた。

このバソプレッシン、TNF で刺激した細胞の酵素活性を DEAE カラムにより分画し無刺激の細胞と比較する (図 30) と、塩化ナトリウム濃度約 0.6M で溶出されるホスホリパーゼ A₂- γ に相当する酵素活性のピークのみが上昇していることがわかった。

これらの結果は、全く異なる刺激によって、ホスホリパーゼ A₂- γ の活性が上昇し、その結果、プロスタグランジン産生の亢進が引き起こされる可能性を示唆している。ホスホリパーゼ A₂- γ は、おもに細胞内で機能し、メサングウム細胞のプロスタグランジン合成に密接に関わりうることが予想された。

バソプレッシンによるホスホリパーゼ A₂- γ 活性の上昇機構としては、タンパク質のリン酸化を介する機構が考えられる。刺激に伴い、酵素蛋白そのものあるいは酵素活性を調節するタンパク質のリン酸化がおこり、その結果、ホスホリパーゼ A₂ 活性の上昇が引き起こされるというものである。Bonventre と Gronich らも、本研究同様、バソプレッシン刺激によりメサングウム細胞のホスホリパーゼ A₂ 活性が上昇することを見いだしている。彼らは、この酵素活性の上昇が、プロテインキナーゼ C を活性化

するホルボールミリステートアセテート (PMA) や、チロシンキナーゼを活性化する上皮増殖因子 (EGF) によっても引き起こされることから、この酵素活性の上昇がタンパク質のリン酸化を介するものであると結論している^{97) 98)}。

一方、TNFによるホスホリパーゼA₂- γ 活性の上昇機構としては、蛋白合成を介する機構が考えられる。実際に、TNF刺激によるプロスタグランジンE₂産生、ホスホリパーゼA₂- γ 活性 (DEAEカラムにおいて塩化ナトリウム濃度約0.6Mにて溶出されるホスホリパーゼA₂活性) の上昇にはlag time (6時間程度) が存在し、蛋白合成阻害剤シクロヘキシミド10 μ Mを、TNFと共に系に添加すると、TNFによる反応はほぼ完全に抑制された。また、TNFによる反応は、細胞内サイクリックAMP濃度を上昇させるフォルスコリン (20 μ M添加、24時間培養) でも引き起こされた。サイクリックAMPを介する反応である可能性も考えられる。

表 5

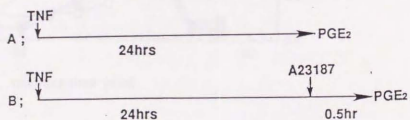
Effect of Vasopressin on PLA₂ Activity and PGE₂ Production

	PLA ₂ (pmol/min)	PGE ₂ (pg)
control	9.9±1.1	2.3±0.5
vasopressin (500nM, 20min)	19.6±0.8	4.0±0.2

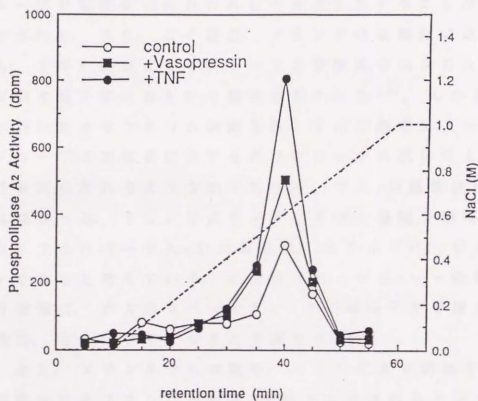
表 6

Effect of TNF on PLA₂ Activity and PGE₂ Production

	PLA ₂ (pmol/min)	PGE ₂ (pg)	
		A	B
control	9.9±1.1	2.3±0.5	7.1±0.8
TNF (1000units/ml, 24hrs)	41.8±1.8	4.2±0.5	21.4±2.0



Elution Profiles of DEAE column of Phospholipase A₂ Activity of Mesangial Cells



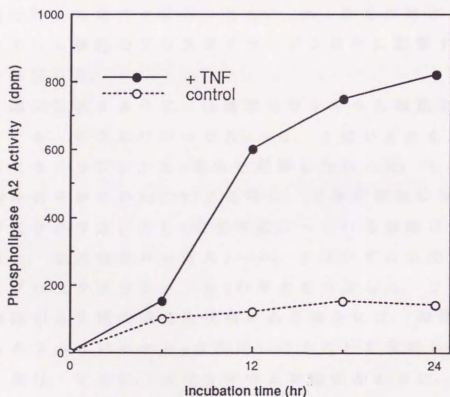
本研究以外に、現在までに、さまざまな細胞において、TNF刺激にともない、ホスホリパーゼA₂活性が上昇することが報告されている。最近、単離されたグループII型ホスホリパーゼA₂のcDNAを用い、ラット血管平滑筋細胞⁷¹⁾、ウサギ軟骨細胞⁶⁹⁾⁷⁰⁾では、TNFによりグループII型酵素のmRNAレベルが上昇することが見いだされた。また、ごく最近、メサンギウム細胞においても、TNF刺激によりグループII型酵素のmRNA上昇が引き起こされるという報告がなされた⁹⁹⁾。しかし、私が用いたメサンギウム細胞では、TNF処理によっても、グループII型酵素に対するポリクローナル抗体により活性が阻害されるようなホスホリパーゼA₂の活性は検出されなかった。TNFによりメサンギウム細胞で誘導されるホスホリパーゼA₂の大部分は、ホスホリパーゼA₂- γ であると考えている。ホスホリパーゼA₂- γ 活性の上昇機構は、ホスホリパーゼA₂- γ の遺伝子が単離された後に、さらに明確になると予想される。

また、メサンギウム細胞を、TNFにより刺激すると細胞外にホスホリパーゼA₂活性が放出されるという報告がある¹⁰⁰⁾¹⁰¹⁾。私が用いたメサンギウム細胞でも、図31に示すように、刺激12時間後ぐらいから、培養液中のホスホリパーゼA₂活性の上昇が観察された。この酵素こそ、分泌のためのシグナルペプチドを有しており、刺激に応じて細胞外に放出されることが報告されているグループII型酵素ではないかと予想したが、この酵素活性は、

グループ I 型および II 型酵素に対するポリクローナル抗体、ホスホリパーゼ A₂- γ に対するモノクローナル抗体いずれとも反応しなかった。この酵素については今後のさらに検討が必要である。

図 31

Release of Phospholipase A₂ Activity
from Rat Mesangial Cells



(c) 細胞外ホスホリパーゼ A_2 のプロスタグランジン
産生亢進作用

ラット腎臓中には、ホスホリパーゼ $A_2-\gamma$ の他に、それぞれ14キログルトン・グループ I 型および II 型ホスホリパーゼ A_2 であるホスホリパーゼ $A_2-\alpha$ 、 β が存在していた。前述したように、これら2つの酵素はシグナルペプチドを有しており、細胞外に放出してから機能する酵素であると考えられる。この節では、メサングウム細胞の外からホスホリパーゼ $A_2-\alpha$ 、 β を作用させ、メサングウム細胞のプロスタグランジン産生に影響するかどうか検討した。

図32に示すように、未処理メサングウム細胞に作用させても、ホスホリパーゼ $A_2-\alpha$ 、 β はいずれも細胞のプロスタグランジン E_2 産生に影響しなかった。しかし、細胞をあらかじめA23187で処理し、未処理細胞に比べてプロスタグランジン E_2 産生が起こっている細胞に作用させると、ホスホリパーゼ $A_2-\alpha$ 、 β はいずれも用量依存的にプロスタグランジン E_2 の産生を亢進した。この結果は、細胞がある種の活性化状態にある場合には、細胞の外からホスホリパーゼ A_2 が作用し得ることを示唆している。

私は、すでに、メサングウム細胞のかわりに、HL-60細胞をレチノイン酸により好中球様に分化させた細胞を用いた場合にも、同様の現象を観察している¹⁰²⁾。いくつかの細胞系において分泌されることが報告されてい

るホスホリパーゼ A_2 は、活性化した細胞の外から作用し、細胞の脂質性メディエーター産生反応に関わっていると考えられる。炎症局所には高い細胞外ホスホリパーゼ A_2 活性が存在し、この酵素活性が脂質性メディエーター産生亢進反応を介し、炎症反応進行に関与すると考えられた。しかし、正常ラットの後肢にホスホリパーゼ A_2 を接種しても炎症反応は惹起されない。炎症をあらかじめ惹起したラットに接種した場合にのみ、炎症反応進行をさらに進めるという効果を示した⁴⁰⁾。この実験からも、活性化した細胞にのみ、細胞外ホスホリパーゼ A_2 が外から作用し得ることが予想された。

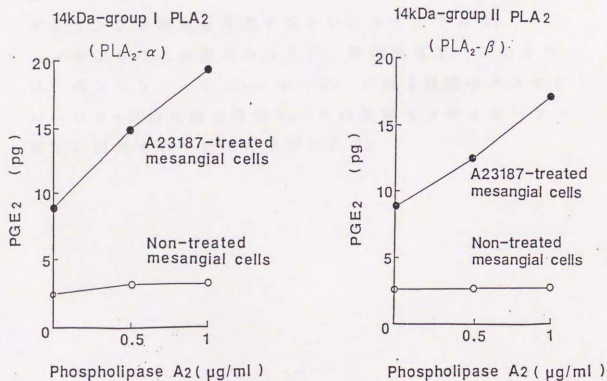
それでは、本実験で用いた A23187 のかわりに、実際に生体内ではいかなる因子が細胞を活性化させ、細胞外ホスホリパーゼ A_2 を作用させやすくするのだろうか。メサングウム細胞をバソプレッシンで刺激しただけでは、細胞外ホスホリパーゼ A_2 の効果は見られなかった。活性化因子はある種の膜作用性物質である必要があると考えられる。その候補としては、最近、ホスホリパーゼ A_2 の作用を増強させる因子として見いだされた PLAP (phospholipase activating protein)¹⁰³⁾¹⁰⁴⁾などが考えられる。この因子は炎症局所(慢性関節リウマチ患者関節腔液)中に見いだされているが、腎臓ほか正常組織でも発現しているかはわかっていない。ごく最近、全一次構造を解明したという報告もあり、今後の研究が待たれる。

また、細胞外ホスホリパーゼ A_2 活性が高い炎症局所中

には、さまざまなホスホリパーゼA₂活性を阻害する因子が存在することが報告されている¹⁰⁵⁾⁻¹⁰⁷⁾。正常組織における細胞外ホスホリパーゼA₂も、その活性を増強する因子、阻害する因子により、高度に調節されている可能性が考えられる。

図 32

Effect of Extracellular Phospholipase A₂ on Prostaglandin E₂ Production of Mesangial cells



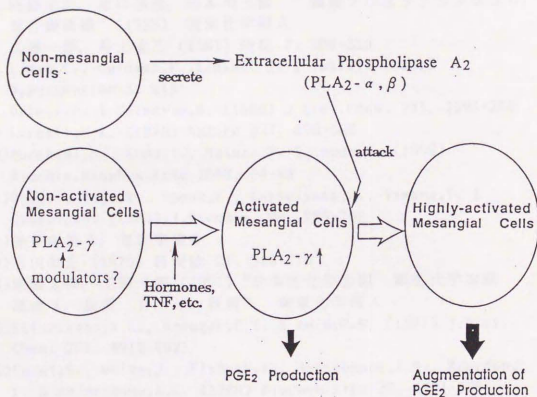
4-3 まとめと考察

以上、腎臓メサンギウム細胞におけるホスホリパーゼ A_2 活性と脂質性メディエーター産生反応の関連をまとめると、図33のようなモデルが考えられた。

メサンギウム細胞が、細胞外からの刺激に应答すると、まず、細胞内に存在するホスホリパーゼ $A_2-\gamma$ の活性が上昇し、その結果として、プロスタグランジン産生の亢進が引き起こされる。そして、メサンギウム細胞以外の細胞から細胞外に分泌されたホスホリパーゼ $A_2-\alpha$ 、 β は、活性化したメサンギウム細胞に作用し、そのプロスタグランジン産生を亢進するというモデルである。

メサンギウム細胞のみならず、腎臓全体で、このように、ホスホリパーゼ $A_2-\alpha$ 、 β 、 γ の3種類のホスホリパーゼ A_2 が協同的に作用し、その脂質性メディエーター産生は調節されていると予想される。

Possible Functions of Rat Kidney Phospholipase A₂



REFERENCES

- 1) Van den Bosch, H. (1982) in Phospholipids (Hawthorne, J.N. & Ansell, G.B. eds.) pp.313-358, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.
- 2) Kunze, H. & Vogt, W. (1971) Ann.N.Y.Acad.Sci. 180, 123-125
- 3) Silvka, S.R. & Insel, P.A. (1988) J.Biol.Chem. 263, 14640-14647
- 4) Albert, D.H. & Snyder, F. (1983) J.Biol.Chem. 258, 97-102
- 5) 阿部圭志, 室田誠逸, 山本尚三編 "講座プロスタグランジン6. 腎と硬組織" (1988) 東京化学同人
- 6) 工藤一郎, 井上圭三 (1987) 炎症 7, 309-325
- 7) Limas, C., Goldman, P., Limas, C.J. & Iwai, J. (1981) Hypertension 3, 219-
- 8) Dole, V.P. & Meinertz, H. (1960) J.Biol.Chem. 235, 2595-259
- 9) Laemmli, U.K. (1970) Nature 227, 680-685
- 10) Murakami, M., Kudo, I., Natori, Y. & Inoue, K. (1990) Biochim.Biophys.Acta 1043, 34-42
- 11) Ono, T., Tojo, H., Inoue, K., Kagamiyama, H., Yamano, T. & Okamoto, M. (1984) J.Biochem. 96, 785-792
- 12) 藤守由美ら, 発表準備中
- 13) 石川康宏 (1979) 日腎誌 21, 308-315
- 14) 原俊太郎, 工藤一郎 (1991) "日本生化学会編 新生化学実験 講座4. 脂質 II. リン脂質" 東京化学同人
- 15) Henrikson, R.L., Kreuger, E.T. & Keim, P.S. (1977) J.Biol.Chem. 252, 4913-4921
- 16) Forst, S., Weiss, J., Elsbach, P., Maragonore, J.M., Reardon, L. & Henrikson, R.L. (1986) Biochemistry 25, 8381-8385
- 17) Puijk, W.C., Verheij, H.M. & De Haas, G.H. (1977) Biochim. Biophys.Acta 492, 254-259
- 18) Fleer, E.A.M., Verheij, H.M. & De Haas, G.H. (1978) Eur.J.Biochem. 82, 261-269
- 19) Evenberg, A., Meyer, H., Gastra, W., Verheij, H.M. & De Haas, G.H. (1977) J.Biol.Chem. 252, 1189-1196
- 20) Verheij, H.M., Westerman, J., Sternby, B. & De Haas, G.H. (1983) Biochim.Biophys.Acta 747, 93-99

- 21) Tojo, H., Ono, T. & Okamoto, M. (1988)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 151, 1188-1193
- 22) Yasuda, T., Hirohata, J., Okumura, T. & Saito, K. (1990)
Biochim. Biophys. Acta 1046, 189-194
- 23) Kozumplik, V., Staffa, F. & Hoffmann, G.E. (1989)
Biochim. Biophys. Acta 1002, 395-397
- 24) Lindahl, M., von Schenck, H. & Tagesson, C. (1989)
Biochim. Biophys. Acta 1005, 282-
- 25) Bennett, C.F., McCarte, A. & Crooke, S.T. (1990)
Biochim. Biophys. Acta 1047, 271-283
- 26) Tojo, H., Ono, T., Kuramitsu, S., Kagamiyama, H. & Okamoto, M.
(1988) J. Biol. Chem. 263, 5724-5731
- 27) Hara, S., Kudo, I., Matsuta, K., Miyamoto, T. & Inoue, K.
(1988) J. Biochem. 104, 326-328
- 28) Hara, S., Kudo, I., Chang, H.W., Matsuta, K., Miyamoto, T. &
Inoue, K. (1989) J. Biochem. 105, 395-399
- 29) Chang, H.W., Kudo, I., Tomita, M. & Inoue, K. (1987)
J. Biochem. 102, 147-154
- 30) Lai, C-Y. & Wada, K. (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 157,
488-493
- 31) Seilhamer, J.J., Pruzanski, W., Vadas, P., Plant, S.,
Miller, J.A., Kloss, J. & Johnson, L.K. (1989) J. Biol. Chem.
264, 5335-5338
- 32) Horigome, K., Hayakawa, M., Inoue, K. & Nojima, S. (1987)
J. Biochem. 101, 625-631
- 33) Hayakawa, M., Horigome, K., Kudo, I., Tomita, M., Nojima, S. &
Inoue, K. (1987) J. Biochem. 101 1311-1314
- 34) Hayakawa, M., Kudo, I., Tomita, M., Nojima, S. & Inoue, K.
(1988) J. Biochem. 104, 767-772
- 35) Mizushima, H., Kudo, I., Horigome, K., Murakami, M.,
Hayakawa, M., Kim, D.K., Kondo, E., Tomita, M. & Inoue, K.
(1989) J. Biochem. 105, 520-525
- 36) Kramer, R.M., Hession, C., Johansen, B., Hayes, G.,
McGray, P., Chow, E.P., Tizard, R. & Pepinsky, R.B. (1989)
J. Biol. Chem. 264, 5768-5775

- 37) Hayakawa, M., Kudo, I., Tomita, M. & Inoue, K. (1988)
J. Biochem. 103, 263-266
- 38) Wright, G.W., Ooi, C.E., Weiss, J. & Eisbach, P. (1990)
J. Biol. Chem. 265, 6675-6681
- 39) Chang, H.W., Kudo, I., Hara, S., Karasawa, K. & Inoue, K.
(1986) J. Biochem. 100, 1099-1101
- 40) Murakami, M., Kudo, I., Nakamura, H., Yokoyama, Y., Mori, H. &
Inoue, K. (1990) FEBS Lett. 268, 113-116
- 41) Ono, T., Tojo, H., Kuramitsu, S., Kagamiyama, H. & Okamoto, M.
(1988) J. Biol. Chem. 263, 5732-5738
- 42) Kanda, A., Ono, T., Yoshida, N., Tojo, H. & Okamoto, M. (1989)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 163, 42-48
- 43) Aarsman, A.J., De Jong, J.G.N., Arnoldussen, E.,
Neyes, F.W., van Wassenaar, P.D. & van den Bosch, H. (1989)
J. Biol. Chem. 264, 10008-10014
- 44) Verger, R., Ferrato, F., Mansbach, C.M. & Pieroni, G. (1982)
Biochemistry 21, 6883-6889
- 45) 高山 喜好, 原俊太郎ら, 発表準備中
- 46) Ohara, O., Takami, M., Nakamura, E., Tsuruta, Y., Fujii, Y.,
Shin, M., Teraoka, H. & Okamoto, M. (1986) J. Biochem. 99,
733-739
- 47) Seilhamer, J.J., Randall, T.L., Yamanaka, M. & Johnson, L.K.
(1986) DNA 5, 519-527
- 48) Sakata, T., Nakamura, E., Tsuruta, Y., Tamaki, M.,
Teraoka, H., Tojo, H., Ono, T. & Okamoto, M. (1989)
Biochim. Biophys. Acta 1007, 124-126
- 49) Komada, M., Kudo, I., Mizushima, H., Kitamura, N. & Inoue, K.
(1989) J. Biochem. 106, 545-547
- 50) Komada, M., Kudo, I. & Inoue, K. (1990)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 168, 1059-1065
- 51) Ishizaki, S., Ohara, A., Yoshida, N., Teraoka, H., Tojo, H. &
Okamoto, M. (1989) Biochem. Biophys. Res. Commun. 162,
1030-1036
- 52) Alonso, F., Henson, P.M. & Leslie, C.C. (1986)
Biochim. Biophys. Acta 878, 273-280

- 53)高山喜好, 知場伸介, 金大敬ら, 発表準備中
- 54)Kim,D.K., Kudo,I. & Inoue,K. (1991) *Biochim.Biophys.Acta*
in press
- 55)Leslie,C.C., Voelker,D.R., Channon,J.V., Wall,M.M. &
Zelarney,P.T. (1988) *Biochim.Biophys.Acta* 963, 476-492
- 56)Channon,J.V. & Leslie,C.C. (1990) *J.Biol.Chem.* 265,
5409-5413
- 57)Diez,E. & Mong,S. (1990) *J.Biol.Chem.* 265, 14654-14661
- 58)Clark,J.L., Milona,N. & Knopf,J.L. (1990)
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87, 7708-7712
- 59)Loeb,L.A. & Gross,R.W. (1986) *J.Biol.Chem.* 261,
10467-10470
- 60)Hazen,S.L., Stuppy,R.J. & Gross,R.W. (1990) *J.Biol.Chem.*
265, 10622-10630
- 61)Murakami,M., Kobayashi,T., Umeda,M., Kudo,I. & Inoue,K.
(1988) *J.Biochem.* 104, 884-888
- 62)村上誠 博士論文
- 63)Hara,S., Chang,H.W., Horigome,K., Kudo,I. & Inoue,K.
(1991) *Methods Enzymol.* in press
- 64)Tojo,H., Ono,T. & Okamoto,M. (1991) *Methods Enzymol.*
in press
- 65)Kudo,I., Chang,H.W., Hara,S., Murakami,M. & Inoue,K.
(1989) *Dermatologica* 170, 72-76
- 66)菊池玲, 矢ノ下良平ら, 発表準備中
- 67)武藤真理子, 笠明美, 新井洋由ら, 発表準備中
- 68)Horigome,K., Hayakawa,M., Inoue,K. & Nojima,S. (1987)
J.Biochem. 101, 53-61
- 69)Lyons-Giordano,B., Davis,G.L., Galbraith,W., Pratta,M.A.
& Arner,E.C. (1989) *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 164,
488-495
- 70)Kerr,J.S., Stevens,T.M., Davis,G.L., McLaughlin,J.A. &
Harris,R.R. (1989) *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 165,
1079-1084
- 71)Nakano,T., Ohara,O., Teraoka,H. & Arita,T. (1990)
FEBS Lett. 261, 171-174

- 72) De Jong, J.G.N., Amertz, H., Aarsman, A.J., Lenting, H.B.M. & van den Bosch, H. (1987) *Eur. J. Biochem.* 164, 129-135
- 73) Wang, P., Toyoshima, S., Osawa, T. (1988) *J. Biochem.* 103, 137-142
- 74) Murayama, T. & Ui, M. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 7226-7233
- 75) Kajiyama, Y., Murayama, T. & Nomura, Y. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* 274, 200-208
- 76) Murayama, T., Kajiyama, Y. & Nomura, Y. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 4290-4295
- 77) Kajiyama, Y., Murayama, T., Kitamura, Y., Imai, S. & Nomura, Y. (1990) *Biochem. J.* 270, 69-75
- 78) Jelsema, C.L. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 163-168
- 79) Jelsema, C.L. & Axelrod, J. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 3623-3627
- 80) Gupta, S.K., Diez, E., Heasley, L.E., Osawa, S. & Johnson, G.L. (1990) *Science* 249, 662-666
- 81) Cockcroft, S. & Stutchfield (1989) *Biochem. J.* 263, 715-723
- 82) Silk, S.T., Clejan, S. & Witkom, K. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 21466-21469
- 83) Narasimhan, V., Holowka, D. & Baird, B. (1990) *J. Biol. Chem.* 264, 1459-1464
- 84) Strosznajder, J. & Strosznajder, R.P. (1989) *J. Lipid Mediators* 1, 217-229
- 85) Wang, J., Kester, M. & Dunn, M.J. (1988) *Biochim. Biophys. Acta*, 963, 429-435
- 86) Hack, N., Clayman, P. & Skorecki, K. (1990) *Bioscience Reports*, 10, 353-362
- 87) Gronich, J.H., Bonventre, J.V. & Nemenoff, R.A. (1990) *Biochem. J.* 271, 37-43
- 88) Morrison, A.R., Winter, W. & Irwin, C.
第7回プロスタグランジン学会要旨集 (1990)
- 89) Morrison, A.R. & Irwin, C. (1990)
1990年アメリカ腎臓学会要旨集
- 90) 宮嶋芳弘, 奥田俊洋, 黒川清 (1990) 腎と透析 28, 681-685

- 91) Schlondorff, D. & Ardaillou, R. (1986) *Kidney Int.* 29, 108-119
- 92) Schlondorff, D. (1987) *FASEB J.* 1, 272-
- 93) Schlondorff, D., Goldwasser, P., Neuwirth, R., Satriano, J.A. & Clay, K.L. (1986) *Am. J. Physiol.* 250, F1123-1127
- 94) Schlondorff, D., Decandido, S. & Satriano, J.A. (1987) *Am. J. Physiol.* 253, C113-120
- 95) Boventre, J.V. & Swidler, M. (1988) *J. Clin. Invest.* 82, 168-176
- 96) Topley, N., Floege, J., Wessel, Haas, R. Radeke, H.H., Kaefer, V. & Resch, K. (1989) *J. Immunol.* 143, 1989-1995
- 97) Gronich, J.H., Boventre, J.V. & Nemenoff, R.A. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 16645-16651
- 98) Gronich, J.H., Boventre, J.V. & Nemenoff, R.A. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 49934-4938
- 99) Sedor, J.R., Sedlak, T.W., Hornbuckle, K., Herman, W.H. & Konieczkowski, M. (1990)
1990年アメリカ腎臓学会要旨集
- 100) Pfeilschifter, J., Pignat, W., Vosbeck, K. & Marki, F. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159, 385-394
- 101) Pfeilschifter, J., Pignat, W., Leighton, J. Marki, F., Vosbeck, K. & Alkan, S. (1990) *Biochem. J.* 270, 269-271
- 102) Hara, S., Kudo, I. & Inoue, K. submitted
- 103) Clark, M.A., Conway, T.M., Shorr, R.G.L. & Crooke, S.T. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 4402-4406
- 104) Clark, M.A., Chen, M.-J., Crooke, S.T. & Bomalaski, J.S. (1988) *Biochem. J.* 250, 125-132
- 105) Suwa, Y., Kudo, I., Imaizumi, A., Okada, M., Kamimura, T., Suzuki, Y., Chang, H.W., Hara, S. & Inoue, K. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 2395-2399
- 106) Takayama, K., Kudo, I., Hara, S., Murakami, M., Matsuta, K., Miyamoto, T. & Inoue, K. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 167, 1309-1315
- 107) 原 俊太郎 修士論文

謝 辞

本研究を進めるにあたり、終始御指導御助言下さった、東京大学薬学部・衛生化学裁判化学教室、井上圭三教授、工藤一郎助教授に深く感謝いたします。また、有用な御助言を数多く頂いた梅田真郷助手、新井洋由助手に深く感謝します。

腎臓メサングウム細胞を供与下さった国立病院医療センター、大島美恵子先生、名取泰博先生に感謝いたします。

研究室での長い時間を共に過ごし、数々のご協力、ご討論、励ましをいただいた東京大学薬学部・衛生化学裁判化学教室の皆さんに感謝します。

最後に、私の研究生生活を暖かく見守ってくれた両親、妻に感謝します。



